

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

***In Vitro* Analyse der Glukose- und Methionin-Restriktion im humanen Modellsystem HeLa sowie im  
Plattenepithelkarzinom HNSCC**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Kyra Frackmann  
aus Darmstadt**

**Würzburg, August 2022**





**Referent bzw. Referentin:**

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

**Korreferent bzw. Korreferentin:**

Prof. Dr. Thomas Müller

**Dekan:**

Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2023**

**Die Promovendin ist Zahnärztin.**

**Für meine Familie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie	2
1.1.3	Klinik und Diagnostik	3
1.1.4	Behandlungskonzepte	4
1.1.5	Prognose	4
1.2	<b>Energie als grundlegender Ansatz in der Krebstherapie</b>	<b>5</b>
1.2.1	Regulation des Energiehaushaltes	6
1.2.2	Der Stoffwechsel proliferierender Zellen – der Warburg-Effekt	11
1.3	<b>Die Glukose-Restriktion</b>	<b>15</b>
1.4	<b>Die Kalorien-Restriktion</b>	<b>16</b>
1.4.1	Die Protein-/Aminosäure-Restriktion	18
1.4.2	Der Low-Energy-Metabolismus als potenzieller Therapieansatz gegen Krebs	20
1.5	<b>Kalorien-Restriktions-Mimetika</b>	<b>22</b>
1.6	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>27</b>
2.1.1	Zelllinien	27
2.1.2	Zellkulturmedien und Zusätze	27
2.1.3	Reagenzien und Chemikalien	28
2.1.4	Geräte	29
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	30
2.1.6	Lösungen und Puffer	30
2.1.7	Kits und Assays	31
2.2	<b>Methoden</b>	<b>31</b>
2.2.1	Kultivierung der Zelllinien	31
2.2.2	Zellzählung	32
2.2.3	Zytotoxizitätsassay (ZytoTox)	33
2.2.3.1	<i>Verdünnungsreihen</i>	33
2.2.3.2	<i>Datenanalyse und Auswertung der Zytotoxizitätsassays</i>	34
2.2.4	Real Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	35
2.2.4.1	<i>RNA-Isolierung</i>	35
2.2.4.2	<i>cDNA-Synthese und real time RT-PCR</i>	36
2.2.4.3	<i>Analyse der Genexpression mittels delta-delta-Ct-Methode</i>	38
2.2.5	Mikroskopie zur optischen Analyse der Zellvitalität	38
2.2.6	Metabolom-Analyse mittels Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie	39
2.2.7	Statistik	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1	<b>Glukose-Restriktion</b>	<b>44</b>
3.1.1	Proliferationsverhalten der Zelllinien HeLa und L929 unter Glukose-Restriktion über einen Zeitraum von drei und fünf Tagen	45
3.1.2	Mikroskopische Analyse der Zellmorphologie der Zelllinien HeLa und L929 über einen Zeitraum von drei und fünf Tagen unter Glukose-Restriktion	47

3.1.3	Einfluss der Glukose-Restriktion auf die biologische Aktivität von TNF $\alpha$ , FasL und Cisplatin in den Zelllinien L929 und HeLa .....	50
<b>3.2</b>	<b>Analyse der CRM Metformin und NAD+ .....</b>	<b>53</b>
3.2.1	Proliferationsverhalten ausgewählter Zelllinien unter Metformin .....	53
3.2.2	Proliferationsverhalten ausgewählter Zelllinien unter NAD+.....	55
<b>3.3</b>	<b>Analyse der Genexpression von FGF-21, IGF-1, Map1lc3B und p53 mittels real-time RT-PCR</b>	<b>57</b>
<b>3.4</b>	<b>Massenspektrometrische Untersuchung der Zelllinie HeLa unter MetR.....</b>	<b>60</b>
3.4.1	Analyse des Proliferationsverhalten der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels automatisierter Zellzählung.....	61
3.4.2	Massenspektrometrische Untersuchung der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen .....	63
3.4.3	Analyse des metabolischen Fingerabdrucks der Zelllinie HeLa nach 72 h unter proliferativen Bedingungen .....	73
3.4.4	Vergleich der massenspektrometrischen Analyse der murinen Fibroblastenzelllinie L929 mit der humanen Tumorzelllinie HeLa unter proliferativen Bedingungen.....	74
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
4.1	Antiproliferative und sensitivierende Wirkung der Glukose-Restriktion auf die Zelllinien L929 und HeLa .....	81
4.2	Induktion eines LEM durch MetR .....	83
4.2.1	Regulation der Genexpression unter MetR bei L929-Zellen.....	84
4.2.2	Antiproliferative Wirkung der MetR auf die Zelllinie HeLa.....	85
4.2.3	Metabolismus unter MetR .....	86
4.2.4	Metaboler Fingerabdruck der MetR.....	91
4.3	Kalorien-Restriktions-Mimetika als potenzielle Therapieoption .....	94
4.4	Ausblick .....	95
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>

## Appendix

- I. Gesamtübersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen
- II. Abkürzungsverzeichnis
- III. Abbildungsverzeichnis
- IV. Tabellenverzeichnis
- V. Danksagung
- VI. Curriculum Vitae
- VII. Publikationen
- VIII. Eidesstattliche Erklärung

# 1 Einleitung

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in der folgenden Arbeit auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich und divers verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

## 1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle zählt zu den malignen, ektodermalen Tumoren epithelialen Ursprungs. Charakteristisch für die Zellen ist ein invasives Wachstum über die Basalmembran hinaus und die Fähigkeit, lokoregionäre Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen zu bilden (Brandt and Petrides, 2014). Man unterteilt Mundhöhlenkarzinome im Allgemeinen nach ihren unterschiedlichen Differenzierungsgraden. Hierbei wird zwischen einer verhornten, einer unverhornten und einer entdifferenzierten Form unterschieden (Ehrenfeld et al., 2011). Mit über 90% stellt das orale Plattenepithelkarzinom die häufigste maligne Erkrankung der Mundhöhle dar (Ferlay et al., 2013). Selbst nach erfolgreicher Therapie leiden die Betroffenen oft an einer stark verminderten Lebensqualität sowie einer erhöhten Morbidität. Daher sind das Mundhöhlenkarzinom, prämaligne Läsionen und Präkanzerosen weiterhin wichtiger Bestandteil der Tumorforschung in Bezug auf mögliche präventive, alternative oder ergänzende Behandlungsmethoden (Hunter et al., 2005). Die Bezeichnung „head and neck squamous cell carcinoma“ (HNSCC) aus dem Englischen wird im Folgenden standardmäßig Verwendung finden und beinhaltet Karzinome der Mundhöhle, der Lippen, des Larynx, des Pharynx sowie des Nasopharynx.

### 1.1.1 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von mehr als 890.000 Neuerkrankungen und 450.000 Todesfällen pro Jahr zählt das orale Plattenepithelkarzinom zu der 7.-häufigsten Krebserkrankung weltweit (Chow, 2020). Allein in Deutschland sind 2% aller Malignome der Klasse der HNSCCs zuzuordnen (Ehrenfeld et al., 2011), wobei Männer im Schnitt häufiger betroffen sind als Frauen (PARKIN, 2005). Die weltweite HNSCC-Inzidenzrate liegt bei Männern bei 8,8 pro 100.000, während der Wert bei Frauen bei 5,1 pro 100.000 Fällen

liegt (Ragin et al., 2007). Auch das durchschnittliche Erkrankungsalter weist geschlechterspezifische Unterschiede auf. So erkranken Frauen im Schnitt erst mit 63 Jahren, Männer bereits in einem Alter von durchschnittlich 61 Jahren. Auch in sozioökonomischer Hinsicht gibt es teilweise gravierende Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit (Johnson et al., 2011). So zeigte eine brasilianische Fall-Kontroll-Studie, dass etwa die Hälfte an HNSCC-Neuerkrankungen im direkten Zusammenhang mit dem sozioökonomischen Status (Arbeitnehmer mit geringem Bildungsgrad und/oder niederen Tätigkeiten) stehen (Hobdell et al., 2003).

Seit 1990 wird zwar ein Abfall von Neuerkrankungen des oralen Plattenepithelkarzinoms wahrgenommen, was hauptsächlich auf den Rückgang des Konsums der beiden Hauptrisikofaktoren Tabak- und Alkoholkonsums zurückzuführen ist, allerdings wird eine steigende Inzidenz des Humanen-Papilloma-Virus-(HPV)-assoziierten HNSCCs wahrgenommen, auf das im Folgenden noch näher eingegangen wird (Gillison et al., 2015, Ehrenfeld et al., 2011).

### **1.1.2 Ätiologie**

Wie bereits erwähnt, stellt der übermäßige Tabak- und Alkoholkonsum als Ursache für das HNSCC mit etwa 75% nach wie vor eine der höchsten Risikofaktoren bei der Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms dar. Dabei haben starke Raucher, die jünger als 46 Jahre alt sind, ein 20-fach erhöhtes Risiko zu erkranken, während der übermäßige Konsum von Alkohol ein 5-fach erhöhtes Risiko darstellt. Besonders gefährlich ist jedoch die Kombination beider Noxen, was das Risiko einer malignen Dysplasie um das 50-fache ansteigen lässt (Hunter et al., 2005, Curado and Boyle, 2013). Zudem spielt auch das oben beschriebene HPV eine Rolle in der Ätiologie (Dayyani et al., 2010). Diese bilden eine Gruppe an unbehüllten DNA-Viren, denen mehrere Subtypen zuteil werden. Zu den sog. „Hochrisikotypen“, die vor allem mit Gebärmutterhalskrebs in Zusammenhang gebracht werden, zählen Typ 16 und 18 (Brandt and Petrides, 2014, Zur Hausen, 2002). Studien identifizierten das „Hochrisiko“-HPV jedoch auch als Risikofaktor für HNSCC unabhängig von den traditionellen Faktoren wie Tabakkonsum und dem Rauchen (D'Souza et al., 2007, Gillison et al., 2000, Gillison and Shah, 2001). Dieses HPV-bedingte Plattenepithelkarzinom korreliert häufig mit sexuellen



Verhaltensweisen wie Oralverkehr und einer steigenden Anzahl an Sexualpartnern (D'Souza et al., 2007, Gillison et al., 2008). Die krebsfördernde Wirkung des HPV ist dadurch zu erklären, dass es für die Proteine E5, E6 und E7 codiert, welche durch ihre wachstumsstimulierende Wirkung als Onkogene fungieren. Auch der Epstein-Barr Virus kann mit dem HSNCC assoziiert werden (Ragin et al., 2007, Hunt et al., 2014). Außerdem spielen Immunsuppression, der Body Mass Index (BMI) in Zusammenhang mit Unterernährung, Ethnizität, oraler Hygiene, bakterieller Besiedelung der Mundhöhle sowie endogenen Ursachen wie Heredität eine Rolle (Warnakulasuriya, 2009). Laut einer internationalen Untersuchung ubiquitärer Bevölkerungsgruppen von INHANCE aus dem Jahr 2012 mit 14.520 Fällen und 22.737 Personen als Kontrollgruppe hat auch die Ernährung erheblichen Einfluss auf die weltweiten Krebsraten. So erkrankten Personengruppen, die viel rotes und verarbeitetes Fleisch aßen, was vor allem auf Menschen aus Japan und Australien zutraf, häufiger an Kopf-/Halskrebs als solche, deren Ernährung einen höheren Anteil an Obst, Gemüse und carotinhaltigen Lebensmitteln beinhaltete (Chuang et al., 2012).

### **1.1.3 Klinik und Diagnostik**

Das Mundhöhlenkarzinom entwickelt sich meist aus einer prämaligen Störung oder auch Präkanzerose. Diese kann sich beispielsweise in Form einer oralen Leukoplakie, einem oralen Lichen planus oder einer aktinischen Cheilitis zeigen und bedarf spätestens nach zweiwöchiger Beobachtung durch den behandelnden Arzt oder Zahnarzt einer histologischen Abklärung (Van der Waal, 2009). Klinisch äußert sich das Bild des HNSCC in der Regel als schmerzlose Schleimhautveränderung, welche sowohl in exophytischer Form als auch in endophytischer Form vorliegen kann. Auch eine gemischt endo-/exophytische Läsion ist denkbar. Prinzipiell kann diese in jedem Bereich der Mundschleimhaut auftreten. Besonders häufig betroffen sind jedoch der anteriore und seitliche Mundboden, das Trigonum retromolare, der Gaumenbogen sowie der seitliche Zungenrand (Ehrenfeld et al., 2011).

Klassifiziert wird das orale Plattenepithelkarzinom mit Hilfe der TNM-Klassifikation, welche Auskunft über den Primärtumor („T“) inklusive Größe und eventuelle Infiltration in Nachbarstrukturen, Lymphknotenbefall („N“) mit Lokalisation und das Vorkommen

von Fernmetastasen („M“) gibt, wobei hier zwischen HPV-assoziiert und nicht-HPV-assoziiert unterschieden wird (Huang and O'Sullivan, 2017).

### **1.1.4 Behandlungskonzepte**

Primäres Ziel ist die Prävention bzw. Frühdiagnostik von prämaligen Läsionen zur Verhinderung einer Manifestation des HNSCC. Hierzu zählt beispielsweise die prophylaktische HPV-Schutzimpfung mit Abklärung des HPV-Status insbesondere bei exponierten Bevölkerungsgruppen. Zudem sollten, vor allem bei Hochrisikogruppen, regelmäßige Mundschleimhautuntersuchungen stattfinden und etwaige Befunde frühzeitig abgeklärt werden (Gillison et al., 2015, Hunter et al., 2005). Bei der Behandlung des Mundhöhlenkarzinoms stehen - je nach Operabilität, histologischem pTNM-Status und Wunsch der zu behandelnden Person - der kurative sowie der palliative Weg zur Verfügung. Außerdem muss entschieden werden, ob eine Monotherapie oder eine Kombinationstherapie stattfinden soll.

Standardtherapie stellt nach wie vor die vollständige Entfernung des Tumors dar. Diese als NO-Resektion beschriebene Methode, beinhaltet auch eine ipsi- oder contralaterale Neck Dissection der Lymphknoten-Level I-III, wobei sich hier an der Lokalisation des Primärtumors orientiert wird. Es wird aber eine standardmäßige Entfernung der Level II-IV diskutiert, da Patienten mit Level IV Metastasen eine signifikant schlechtere Überlebensrate haben (Lim et al., 2006). Zusätzlich erfolgt nach der chirurgischen Resektion meist eine Nachbestrahlung oder Radiochemotherapie. Alternativ kann eine Vorbehandlung durch Radiatio, Chemotherapie oder Kombination beider Verfahren mit anschließender postoperativer Aufsättigung erfolgen.

### **1.1.5 Prognose**

Die Prognose des oralen Plattenepithelkarzinoms variiert stark je nach Stadium und Tumorformel. So haben Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren eine wesentlich bessere 5-Jahres-Überlebensrate als solche mit nicht-HPV-assoziierten Läsionen (HPV+ 77%, HPV- 32%). Weitere Faktoren wie das Erreichen des NO-Resektionsstatus, Metastasierungsgrad (lokoregionäre Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen), adjuvante Radiatio oder Radiochemotherapie, das Geschlecht sowie die Ethnizität

spielen ebenfalls eine Rolle. Ungeachtet sämtlicher Zusatzfaktoren hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten Jahren kaum verbessert und liegt nach wie vor bei ca. 50-60% (Novotny et al., 2020). Wichtiger Bestandteil sind auch die Nachsorgeintervalle zur Früherkennung von Rezidiven oder gar Metastasen. Diese werden größer, je länger die Erstdiagnose zurückliegt. So sollten im ersten Jahr nach der Diagnose monatliche Nachsorgeuntersuchungen stattfinden, im zweiten zweimonatliche, im dritten Jahr sollte die Kontrolle vierteljährlich erfolgen und ab Jahr vier nach Erstdiagnose wird den Patienten empfohlen, sich jedes halbe Jahr einer Kontrolluntersuchung zu unterziehen. Die Verfolgung dieses Prozedere stellt insbesondere beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-/Halsbereiches einen wichtigen Bestandteil der Therapie dar, da diese Patienten mit 15% eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit aufweisen, in den nächsten sieben bis zehn Jahren Zweitkarzinome zu entwickeln (Ehrenfeld et al., 2011).

## **1.2 Energie als grundlegender Ansatz in der Krebstherapie**

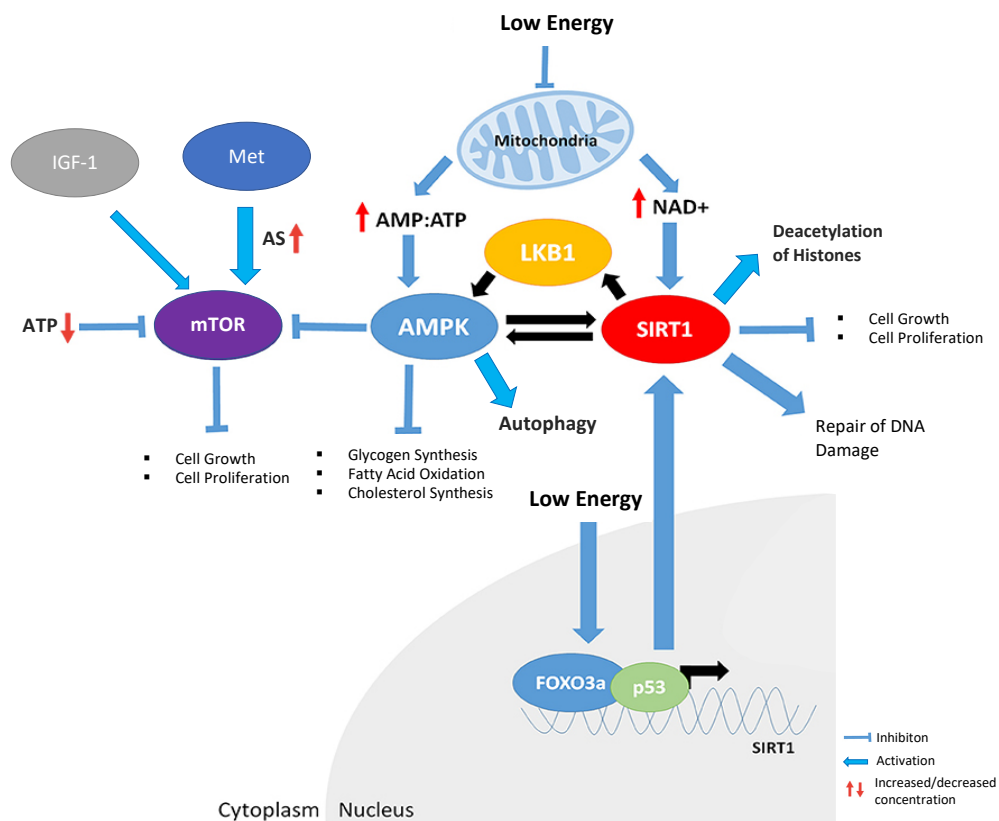
Entzieht man einem Organismus Energie, so fährt dieser seinen Stoffwechsel auf die für den Erhalt notwendigen Mechanismen herunter (Daniel and Wenzel, 2014). Nicht so Tumorzellen, welche auch bei bestehendem Energiemangel bevorzugt den Stoffwechselweg der anaeroben Glykolyse mit Laktat als Endprodukt (Warburg-Effekt) nutzen. In den letzten Jahren konnten Studien belegen, dass ein Energiemangel gesundheitsfördernde und lebensverlängernde Wirkung haben kann (Escobar et al., 2019, Ball et al., 1947). Dabei können Mechanismen mittlerweile auf metabolischer und molekularbiologischer Ebene beschrieben werden, die zu diesen positiven Effekten führen. Das Tumorwachstum und die Metastasenbildung können beispielsweise durch die Regulation von Faktoren wie mechanistic Target of Rapamycin (mTOR), Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) und Fibroblast-growth-factor-21 (FGF-21), welche im Folgenden noch näher erläutert werden, wesentlich beeinflusst werden (Ables et al., 2016). Energie und Metabolismus bieten somit einen interessanten Ansatz sowohl in der Krebstherapie als auch bei der generellen Vermeidung von altersbedingten Morbiditäten. Um zu verstehen, wie man das Energie-Level einer Zelle effektiv nutzen kann und wo es mögliche Ansatzpunkte für eine Krebstherapie geben könnte, ist es von elementarer Bedeutung, die Regulation des Energiehaushaltes einer Zelle zu verstehen.

### 1.2.1 Regulation des Energiehaushaltes

Im Wesentlichen spielen folgende Faktoren und Komplexe eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Energiehaushaltes:

1. mTOR
2. Autophagie
3. Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK)
4. Liver-Kinase-B1 (LKB1)
5. Sirtuine
6. extrazelluläre Regulation durch IGF-1 und FGF-21

### Regulation des Energiehaushaltes



**Abb. 1: Die Regulation des Energiehaushaltes einer Zelle im Überblick (modifiziert nach (Gillespie et al., 2016))**  
 Durch niedrige Energie-Spiegel wird über verschiedene Mechanismen mTOR gehemmt, wodurch Wachstum und Proliferation inhibiert werden. Faktoren wie das AMP/ATP-Verhältnis, NAD<sup>+</sup> oder Aminosäure-Level und Wachstumsfaktoren wie IGF-1 können über unterschiedliche Signalwege ebenfalls mTOR hemmen. Die Aktivierung der AMPK, der LKB1 oder die vermehrte Expression von SIRT1 kann Prozesse wie die Autophagie, Deacetylierung von Histonen, oder vermehrte DNA-Reparaturen einleiten.

Zentrales Element in der Zellregulation ist der Proteinkomplex **mTOR**. Er ist einer der Schlüsselregulatoren und eine Art „Schaltzentrale“, die über Proliferation, Autophagie, Wachstum oder Regeneration entscheiden kann. Viele Signale der Sensoren und Regulatoren laufen bei mTOR zentral zusammen. Eine Schlüsselrolle bei dessen Aktivierung spielt vor allem das kleine G-Protein Rheb, das seinerseits durch Aminosäurekonzentrationen sowie Wachstumsfaktoren wie Insulin reguliert wird (Long et al., 2005, Rocco et al., 2006). Steigt das Energie-Level in einer Zelle an, korreliert dies mit einem hohen Adenosintriphosphat (ATP)-Level bzw. niedrigen Adenosinmonophosphat (AMP)/ATP-Quotienten, was wiederum mTOR stimuliert und zu vermehrtem Zellwachstum und gesteigerter Proliferation führt (Abb. 1). Zusätzlich führt eine Verminderung von freien Aminosäuren, vor allem die essentieller, wie Methionin (Met) zu einer Inhibition von mTOR (Saxton and Sabatini, 2017, Weichhart, 2018). Dieses kann im Prinzip als Aminosäure-Sensor bezeichnet werden, wobei zu beachten ist, dass mTOR hierbei nur das Effektormolekül ist. Aminosäure-Sensoren sind erstens der G-Protein-gekoppelte Rezeptor T1R, der in der Lage ist, die extrazelluläre Aminosäurekonzentration zu messen und zusätzlich dazu fähig ist, mTOR zu regulieren (Zhou et al., 2016). Zweitens gibt es intrazellulär spezifische Adaptermoleküle für ausgesuchte Aminosäuren wie Arginin, Leucin und Met. So zum Beispiel die Leucin-Sensoren Leucyl-tRNA-Synthase und Sestrin2, welche Leucin erkennen und bei einem hohen Spiegel über Protein-Protein-Wechselwirkungen zu einer Aktivierung von mTOR beitragen. Auch CASTOR1, ein wirbeltierspezifisches Protein, das als zytosolischer Arginin-Sensor fungiert und das in dessen Abwesenheit zu einer Inaktivierung von mTOR beiträgt, gehört zu diesen Adaptermolekülen (Goberdhan et al., 2016). Met wird nur indirekt über SAMTOR gemessen, das eigentlich ein S-Adenosylmethionin (SAM)-Sensor ist, welcher bei fehlendem SAM negativen Einfluss auf die mTOR-Aktivität nehmen kann (Gu et al., 2017). SAM wiederum entsteht aus der Reaktion von Met und ATP, wodurch eine geringe Met-Konzentration direkten Einfluss auf SAMTOR hat und somit mTOR hemmt. Ein wichtiger Effekt, der unter anderem aus der Inhibition von mTOR resultieren kann, ist die Induktion der Autophagie (Kim et al., 2011).

Die **Autophagie** beschreibt die Pflege des Proteoms durch das Verdauen bzw. das Recycling zelleigener dysfunktionaler und beschädigter Proteine und Organellen. Diese Fähigkeit ermöglicht es, Metaboliten zu regenerieren und defekte Zellbestandteile aus der Zelle zu entfernen. Die Autophagie kann neben der Apoptose und der Nekrose bzw. Nekroptose (programmierte Nekrose) sogar als dritte Form des Zelltods fungieren (Denton and Kumar, 2019), da die Zelle sich über diesen Mechanismus auch komplett selbst verdauen kann. Durch die Autophagie kann so bei Nährstoffmangel - neben der Regeneration - eine Neuverteilung der Ressourcen stattfinden (Rubinsztein et al., 2011). Die Anhäufung von sogenanntem „Zellschrott“ ist auch ein Symptom des Alterns und führt zu fortschreitender Progression von Zelldegeneration und Störung der zellulären Homöostase (Fîlfan et al., 2017), was letztendlich mit einem erhöhten Risiko des Zelltods einhergeht (Codogno and Meijer, 2005). Studien von Escobar und Kollegen aus dem Jahr 2019 haben gezeigt, dass unter anderem durch eine vermehrte Autophagie die Lebensspanne von Hefen und Mäusen signifikant erhöht werden kann und dass non-humane Primaten sowie Menschen weniger altersbedingte Pathologien und ein reduziertes Risiko für altersbedingte chronische Morbiditäten aufweisen (Escobar et al., 2019). Wichtig ist auch, dass bereits die alleinige Hemmung von mTOR, ungeachtet der Autophagie, positiven Einfluss auf die Lebensspanne hat (Escobar et al., 2019, Tyler and Johnson, 2018). Eine Möglichkeit ist der durch Energiemangel hervorgerufene erhöhte AMP/ATP-Quotient, der zur Aktivierung der Autophagie über AMPK führen kann (Kim et al., 2011, Lim et al., 2010).

Die **AMPK** ist ein heterotrimeres Protein, das in allen eukaryotischen Geweben vorkommt und dessen Aufgabe vor allem darin besteht, Zellen durch Regulation vor einem ATP- also Energiemangel zu schützen. Eine aktivierte AMPK fördert katabole Prozesse. Stoffwechselwege, die ATP produzieren, werden stimuliert, während ATP-verbrauchende, also AMP-produzierende Wege gehemmt werden. Dies geschieht durch gezielte Inhibition der Transkription bestimmter Enzyme, die für das Fortlaufen anaboler Stoffwechselwege wie beispielsweise die Glykogen- oder Fettsäurebiosynthese essentiell sind ebenso wie durch Aktivierung von Enzymen, welche für das Gegenteil - also beispielsweise für die Glykolyse - verantwortlich sind. So kann der AMP/ATP-

Quotient bzw. das Energie-Level reguliert werden, weswegen die AMPK als eine Art AMP/ATP-Sensor angesehen werden kann (Lim et al., 2010, Wojtaszewski et al., 2002). Die Aktivierung der AMPK erfolgt auch mittels Phosphorylierung durch die LKB1 (Abb. 1).

Der Tumorsuppressor **LKB1** ist eine Serin/Threonin-Kinase und fungiert als wichtigste Upstream-Kinase der AMPK, wodurch sie ebenfalls eine Rolle in der mTOR-Regulation spielt. Ihre eigene Aktivität ist allerdings nicht direkt AMP-abhängig (Shaw et al., 2004). Neben der Aktivierung der AMPK stimuliert sie mindestens 11 weitere AMPK-verwandte Kinasen durch direkte Phosphorylierung (Lizcano et al., 2004). LKB1 ist an einer Reihe von wichtigen zellulären Prozessen beteiligt, die von der Stoffwechselkontrolle bis zur zellulären Polarisierung reichen (Boudeau et al., 2003), die wiederum Einfluss auf das Wachstum von Tumoren nehmen können. So spielt dieser „Leber-Sensor“ auch eine bedeutende Rolle in der hepatischen Glukosehomöostase. In Abwesenheit von LKB1 in der Leber kommt es zu Hypoglykämie und vermehrter glukoneogener und lipogener Genexpression. Hinzu kommt, dass das am meisten verwendete Diabetes-Typ-2-Medikament Metformin ohne LKB1 seine Wirkung auf den Serumglukosespiegel verliert, wodurch die erwünschte Blutzuckerspiegelsenkung nicht zu stande kommen kann (Shaw et al., 2005).

Eine weitere Gruppe, die im Zusammenhang mit Energiemangel aktiv wird, ist die multifunktionale Proteingruppe der **Sirtuine**. Dies sind Deacetylasen, die einem Nicotinamidadenindinukleotid+ (NAD<sup>+</sup>) abhängigen Mechanismus unterliegen (Oberdoerffer et al., 2008). Bei einem erhöhten NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnis, was mit einem Energiemangel einhergeht, kommt es zur vermehrten Expression von Sirtuin 1 (SIRT1). Die darauffolgende Deacetylierung von LKB1 und AMPK führt nachfolgend zu einer Steigerung ihrer Aktivität (Gillespie et al., 2016). Eine erhöhte Aktivität der AMPK kann allerdings auch andersherum die Sirtuin-Aktivität modulieren (Cantó et al., 2009). Sirtuine fungieren also als eine Art NAD<sup>+</sup>-Sensor. Zusätzlich hängt die Genexpression von SIRT1 auch mit der Interaktion mit dessen Substraten, den Transkriptionsfaktoren FOXO3a und p53, ab. Diese binden bei Nahrungskarenz an den SIRT-Promotor und sind somit in der Lage, die SIRT-Expression zu steigern (Nemoto et al., 2004). Außerdem sind

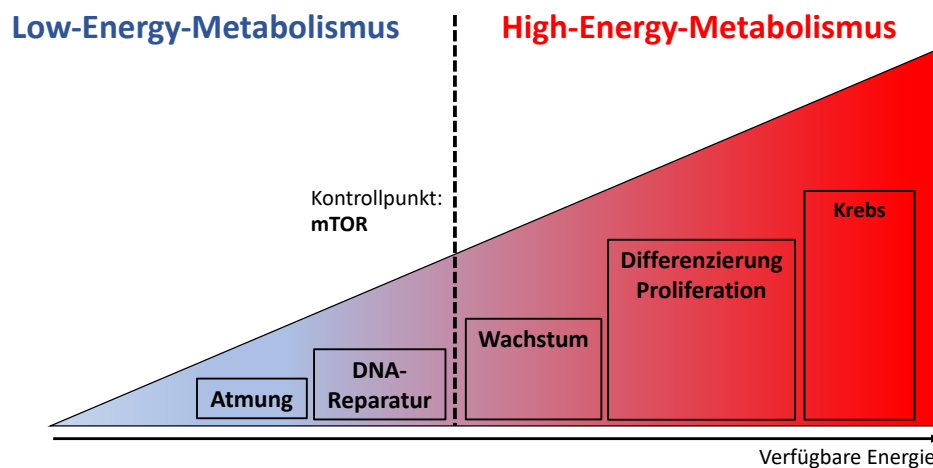
einige Sirtuine dazu in der Lage, Histone zu deacetylieren. Diese Histone-Deacetylierung erhöht die Affinität des Histons zum negativ geladenen DNA-Gerüst und führt somit zu einer Verdichtung der Chromatinstruktur, was wiederum die Transkription herunterreguliert (Brix et al., 2014). Dadurch spielen die Sirtuine auch in der sog. Epigenetik (die genetische Modifikation ohne Änderung der DNA-Sequenz) eine wichtige Rolle.

Neben den oben beschriebenen intrazellulären Signalkaskaden kann der Energiehaushalt auch durch extrazelluläre Faktoren beeinflusst bzw. gesteuert werden. Eine tragende Funktion erfüllen hier die Gegenspieler **IGF-1** und **FGF-21**. Während IGF-1 insulinähnliche Wirkung zeigt und der Zelle zu verstehen gibt, es würden ausreichend Energiequellen zu Verfügung stehen und somit den anabolen Stoffwechsel induziert (Laron, 2001), stellt FGF-21 genau das Gegenteil dar und signalisiert der Zelle, sich in einer Nahrungskarenz zu befinden (Fisher and Maratos-Flier, 2016). IGF-1 entsteht hauptsächlich in der Leber und dem Fettgewebe. Es wird unter Stimulation von Somatotropin bei erhöhter Aufnahme von Kohlenhydraten gebildet und fungiert als wesentlicher Faktor für die Steuerung des Zellwachstums. So wirkt es unter anderem durch ständige Liganden-Rezeptor-Impulse positiv auf die Proliferation von Tumorzellen (Brown-Borg and Bartke, 2012, Masternak and Bartke, 2012). Eine verminderte Growth-Hormon-Rezeptor(GHR)-IGF-1-Aktivität steht außerdem im direkten Zusammenhang mit einer verminderten Krebsrate (Levine et al., 2014). Der Gegenspieler FGF-21, ein Hepatokin, wird hauptsächlich bei Energiemangel sekretiert. Neben dem vermehrten Einbau von GLUT1- (Kharitonov et al., 2005) und GLUT4-Transportern in die Zellmembranen und der damit einhergehenden insulin-unabhängigen Senkung des Blutglukosespiegels, induziert ein erhöhter FGF-21 Spiegel die vermehrte Glykogeneinlagerung sowie eine verminderte Glukoneogenese in Leberzellen und senkt dadurch zusätzlich den Blutglukosespiegel (Liu et al., 2018).

Wie gezeigt, ist mTOR ein Dreh- und Angelpunkt, bei dem viele der beschriebenen Regulationsmechanismen zusammenlaufen, wodurch der energetische Zustand der Zelle permanent gemessen werden kann. Dabei umfasst der Begriff Energie eine ganze Reihe an Molekülen. Neben Glukose können dies ADP/ATP, Guanosintriphosphat (GTP),



NAD<sup>+</sup>/NADH aber auch - für die Proliferation absolut unerlässlich - ausreichend Aminosäuren sein, auf deren Rolle später noch genauer eingegangen wird. Die Möglichkeit der Zellen, ihren Stoffwechsel bei Energiemangel zu regulieren und gegebenenfalls herunterzufahren, wird im Folgenden als Low-Energy-Metabolismus (LEM) bezeichnet. Dabei soll ausdrücklich betont werden, dass dies kein „Hungerzustand“ ist. Der LEM ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.



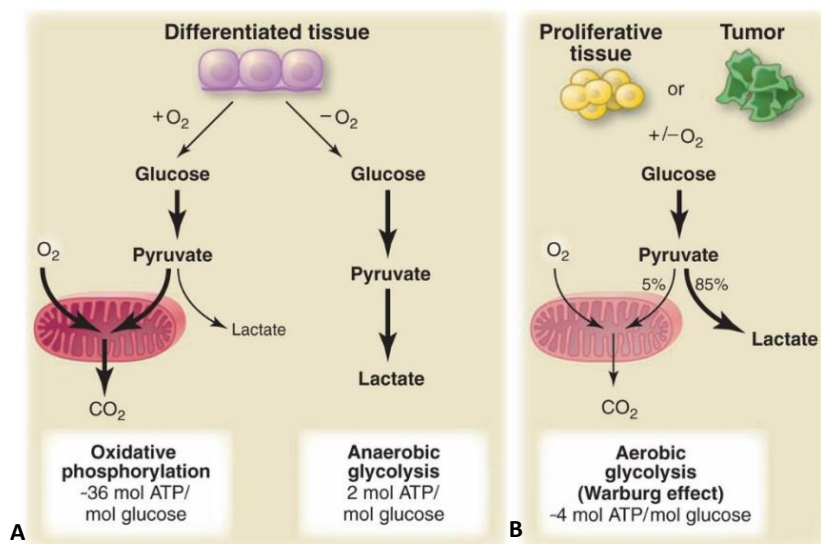
**Abb. 2: Schematische Darstellung eines Low-/ bzw. High-Energy-Metabolismus (modifiziert nach (Koderer, 2021))**  
 In einem LEM schaltet die Zelle auf einen Stoffwechsel um, der im Wesentlichen lebenswichtige Prozesse wie die Zellatmung oder DNA-Reparaturen beinhaltet. Hat die Zelle genug Energie, befindet sie sich in einem High-Energy-Metabolismus. Es kommt zusätzlich zu Wachstum, zur Differenzierung und zur Proliferation. Entscheidende Instanz zwischen beiden Stoffwechselzuständen ist der Proteinkomplex mTOR.

Für den Versuch durch Energieentzug einen LEM in proliferierenden Zellen hervorrufen zu können, ist es essentiell, die veränderte Stoffwechsellage in Krebszellen bzw. proliferierenden Zellen zu verstehen. Diese wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

### 1.2.2 Der Stoffwechsel proliferierender Zellen – der Warburg-Effekt

Damit mögliche Ansatzpunkte in der Krebstherapie auch effizient Anwendung finden können, ist es essentiell, sich mit dem Stoffwechsel proliferierender (Tumor-) Zellen auseinander zu setzen. Dieser unterscheidet sich grundlegend von dem nicht-prolierierenden Zellen. Während sich differenzierte Zellen bei ihrer Energiegewinnung hauptsächlich der aeroben Glykolyse bedienen, das heißt, die Glukose im Beisein von Sauerstoff über den Zitratzyklus und die oxydative Phosphorylierung in 32-36 mol ATP/ mol Glukose umwandeln und es zu CO<sub>2</sub> als Endprodukt kommt, entdeckte Otto Warburg

schon 1924, dass dies bei Tumorzellen nicht der Fall ist. Diese beziehen ihre Energie häufig trotz ausreichender Sauerstoffversorgung durch die sogenannte anaerobe Glykolyse, wobei im wesentlichen Laktat statt Pyruvat entsteht und lediglich 2 mol ATP/mol Glukose synthetisiert werden (Vander Heiden et al., 2009, Warburg et al., 1924). Da in proliferierenden Zellen und Tumorgewebe die Mitochondrien noch funktionsfähig sind, wird ein geringer Teil des Pyruvats weiterhin zu CO<sub>2</sub> abgebaut, was den Unterschied der anaeroben Glykolyse von 2 ATP/ mol Glukose in differenziertem Gewebe zu 4 ATP/ mol Glukose in proliferierendem Gewebe erklärt (Abb. 3)



**Abb. 3 A + B: Energiegewinnung differenzierter Zellen im Vergleich zu proliferativen-/Tumorzellen.**

Differenziertes Gewebe (A) bezieht die Energie im Beisein von Sauerstoff vor allem über die aerobe Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung, bei der Glukose in Pyruvat umgesetzt wird und später CO<sub>2</sub> als Endprodukt entsteht. Dieser Prozess bringt der Zelle 36 mol ATP/mol Glukose. Fehlt Sauerstoff, wird das Pyruvat in Laktat umgesetzt, wobei nur 2 mol ATP/ mol Glukose entstehen. Bei proliferierendem Gewebe und Tumorzellen (B) wird 85% des Pyruvats trotz dem Vorhandensein von Sauerstoff zu Laktat umgesetzt und nur ein geringer Teil wird zu CO<sub>2</sub> abgebaut, was letztendlich zu einer Ausschüttung von 4 mol ATP/ mol Glukose führt. Dieser Effekt wird als Warburg-Effekt bezeichnet. Darstellung aus (Vander Heiden et al., 2009)

Diese „Ineffizienz“ der Energiegewinnung wird jedoch durch die enorme Geschwindigkeit der Glukoseumsetzung weitestgehend kompensiert. Diese erfolgt 10-100 Mal schneller als in differenzierten Geweben und die ATP-Ausbeute in einem bestimmten Zeitraum ist somit vergleichbar (Shestov et al., 2014).

Die Frage, warum proliferierende Zellen den Warburg-Mechanismus nutzen, ist bis dato nicht vollständig geklärt. Es gibt verschiedene Theorien, die von der Aufrechterhaltung von Redox- und Energiepotenzialen über die Unterstützung der Biomasseproduktion bis

hin zu durch den Warburg-Metabolismus induzierten Signaltransduktionsmechanismen, die der Zelle wachstumsregulierende Eigenschaften verleihen könnten, ausgehen (Liberti and Locasale, 2016, Locasale and Cantley, 2011). Insgesamt sind aber vermutlich mehrere Gründe dafür ursächlich.

Auf die für diese Arbeit wichtigsten Gründe soll im Folgenden näher eingegangen werden: Eine ineffiziente ATP-Produktion ist nur dann ein Problem, wenn die Ressourcen knapp werden. Die Glukoseversorgung ist aber durch eine hohe Durchblutung gewährleistet. Zudem wirkt eine Akkumulation von ATP limitierend auf den Stoffwechsel, was bei proliferierenden Zellen durch ihre hohen Verhältnisse an ADP/ATP vermieden wird. So ermöglicht der veränderte Stoffwechsel ein rasantes Wachstum und somit einen Selektionsvorteil gegenüber dem umliegenden Gewebe. Die gesamte Glukose in ATP umzusetzen, würde dem aufgrund der wesentlich geringeren Geschwindigkeit zuwiderlaufen (Vander Heiden et al., 2009).

Zusätzlich haben proliferierende Zellen vermutlich wichtige metabolische Anforderungen, die über das Vorhandensein von ATP hinausgehen. So ist der Bedarf an der gesamten Biomasse, also Nukleotiden, Aminosäuren und Lipiden, deutlich höher, damit sich die Zelle teilen kann. Dadurch benötigen proliferierende Zellen beispielsweise mehr reduzierte Äquivalente wie NADPH für die de-novo-Lipidsynthese als ATP. Eine erhöhte Glukoseumsetzung fördert unter anderem die Synthese dieser Äquivalente im oxidativen Zweig des Pentosephosphatweges und garantiert somit einen Anstieg der Lipidsynthese (Liberti and Locasale, 2016). Zusätzlich publizierten Hosios und Kollegen 2016 in „Developmental Cell“, dass proliferierende Zellen nicht wie vielleicht auf den ersten Blick angenommen durch Glukose den Hauptteil ihrer Zellmasse generieren, sondern die Proteine, die den Hauptteil der Biomasse ausmachen, vielmehr aus exogen zugeführten Aminosäuren, wie Glutamin und Serin hergestellt werden. Glukose dagegen dient als schneller Energielieferant, hält den „Zellmotor“ am Laufen - wird also im Grunde durch die Zelle hindurchgeschleust - und in Form von Laktat wieder sekretiert (Hosios et al., 2016).

Zudem gibt es einen weiteren Selektionsvorteil. Dieser zeigt sich bereits bei prämaligen Läsionen, bei denen die Zellen einen Vorteil haben, die der lokal aufflammenden Azidose

standhalten, welche durch den akkumulierenden extrazellulären Laktatspiegel entsteht. Es wird diskutiert, dass diese Resistenz gegen säureinduzierte Zelltoxizität die ungehemmte Proliferation und Invasion von entarteten Zellen fördern könnte (Gatenby and Gillies, 2004).

Eine Tumorzelle benötigt letztendlich mehr Energie für ihren anabolen Stoffwechsel und die fortwährende Teilung, als eine differenzierte Zelle (Tanner and Rutter, 2016). Es wurde allerdings festgestellt, dass proliferierende Zellen im Schnitt gar nicht so viel mehr Energie benötigen, wie man vielleicht annehmen könnte. Ca. 30% der verbrauchten Energie wird während eines Teilungszyklus für die Proliferation selbst benötigt, die restliche Energie dient der Aufrechterhaltung der Zellhaushaltes (Locasale and Cantley, 2011). Dies ist unter anderem auf Berechnungen zurückzuführen, die zeigen, dass die benötigte Menge an ATP, die eine Säugerzelle für das Wachstum und die Teilung benötigt geringer ist, als die Menge, die für die zelluläre Grundversorgung notwendig ist (Kilburn et al., 1969). Das ist dadurch zu erklären, dass 90% der Proteine nur eine Halbwertszeit von Minuten bis hin zu einigen Stunden aufweisen, das heißt, dass der Großteil des ATPs allein zur Aufrechterhaltung des Proteoms verwendet werden muss, nicht etwa zur Produktion von Proteinen bei der Bildung einer neuen Zelle (Eden et al., 2011).

Eines der Hauptmerkmale einer Krebszelle ist die unkontrollierte und raumfordernde Proliferation. Aus diesem Grund bietet die Inhibition der Proliferation einen der grundlegendsten Ansätze in der Tumorthherapie. Fasst man die bisher genannten Argumente zusammen, ergeben sich drei allgemeine Strategien:

1. Die Glukoseabhängigkeit der Tumorzelle zum Aufrechterhalt ihres Stoffwechsels sowie
2. Der durch Kalorien-Restriktion hervorgerufene Entzug der zusätzlich benötigten Energie und
3. Der durch eine Protein-/ bzw. Aminosäure-Restriktion ausgelöste Verlust der Fähigkeit, neue Biomasse zu generieren, deren Vermehrung für Wachstum und Proliferation unabdingbar sind.

Wobei zu beachten ist, dass die Ansätze zwei und drei nicht zuletzt durch ihren gemeinsamen „Hauptangriffspunkt“ mTOR sehr eng zusammenspielen und auf molekularer Ebene teilweise ähnliche Signalwege stimulieren. Alle drei Strategien sollen hier verfolgt und genauer dargelegt werden.

### **1.3 Die Glukose-Restriktion**

Tumor- und proliferierende Zellen sind, wie oben bereits beschrieben, durch den Warburg-Metabolismus auf eine erhöhte Glukoseversorgung angewiesen, um ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten, damit das Hauptziel, ständiges Wachstum und Proliferation, gewährleistet ist. Diese erhöhte Glukoseaufnahme bei Tumorzellen ist auch in der Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomografie (PET/CT) sichtbar (Chua et al., 2007). Die Hypothese lautet also, dass Krebszellen Glukose durch ihre Abhängigkeit in einem wesentlich höheren Maß benötigen, als es die übrigen Gewebe tun. Indes löst eine Hemmung des Glukosestoffwechsels bei Zellen viele metabolische Folgeerscheinungen aus. So fördert es den Katabolismus und führt zum Stillstand des Zellzyklus oder zum Zelltod. Hinzu kommt, dass ein Glukoseentzug bzw. antiglykotische Medikamente zu ATP-Verlust führen. Dadurch wird mTOR gehemmt und die AMPK aktiviert, welche ebenfalls mTOR herunterreguliert und den Tumorsupressor p53 aktiviert, welcher seinerseits den Zelltod fördert (El Mjiyad et al., 2011). p53 verlangsamt außerdem die Glykolyse, indem es unter anderem die Expression von Glukose-Transportern herunter reguliert und die oxidative Phosphorylierung steigert (Vousden and Ryan, 2009). Hinzu kommt, dass mit einer Hemmung der Glykolyse ein erhöhtes NAD<sup>+</sup>-Level einhergeht, was wiederum SIRT1 aktiviert (Murayama et al., 2008). Es stellt sich also die Frage, ob eine gezielte Glukose-Restriktion auch in der Krebstherapie Anwendung finden kann.

Wie El Mjiyad und Kollegen in ihrem Review „Sugar-free approaches to cancer cell killing“ darlegten, können ein Glukoseentzug und antiglykotische Medikamente den Tod von Tumorzellen durch Nekrose und Apoptose induzieren (El Mjiyad et al., 2011). So wirkt beispielsweise das Antiglykotikum 2-Desoxyglukose (2-DG) vor allem in Kombination mit Chemotherapeutika, indem es die Tumorzellen für diese sensibilisiert (Egler et al., 2008, Hernlund et al., 2009, Yamada et al., 1999). Außerdem erhöht es die Strahlensensitivität

unter anderem bei HeLa-Zellen (Dwarakanath et al., 1999). Auch weitere glykotische Inhibitoren wie Lonidamin und 3-Brom-Pyruvat zeigten Effekte gegen Tumorzellen auf (Geschwind et al., 2002, Ko et al., 2004, Rosbe et al., 1989). Zudem wirkt eine Glukose-Restriktion vermutlich dem Warburg-Mechanismus entgegen. Diese Vermutung kommt zustande, da in Brustkrebszellen unter zellulärem Glukoseentzug die Laktatsekretion verringert wurde, was den Glukoseverbrauch sowie die ATP-Produktion ansteigen ließ und eine Stimulation der oxidativen Phosphorylierung zur Folge hatte (Tahtouh et al., 2019).

Zusammenfassend wird also deutlich, dass eine Glukose-Restriktion sowohl dem Warburg-Metabolismus entgegenwirken als auch über verschiedene metabolische Faktoren, wie der Regulierung von mTOR, Einfluss auf Wachstums- und Proliferationsverhalten nehmen kann.

### **1.4 Die Kalorien-Restriktion**

Wie im Kapitel „Der Stoffwechsel proliferierender Zellen – der Warburg-Effekt“ beschrieben, benötigen proliferierende Zellen zwar mehr Energie als eine sich nicht-teilende Zelle, allerdings ist dieser Energiebetrag mit ca. 30 % zusätzlich bei weitem nicht so groß wie häufig angenommen. Auch wenn das „Mehr an Energie“ nicht extrem hoch ist, ist für die Zelle entscheidend, ob eine Proliferation energetisch möglich ist. Nur wenn ausreichend Energie für eine Teilung vorhanden ist, kann und wird sich eine Zelle nach dem „Alles oder Nichts Prinzip“ teilen - (Abb. 2). Fehlt es an essenziellen Komponenten, wie z.B. an für die Proliferation unerlässlichen Aminosäuren, schaltet die Zelle in den LEM um.

Der geringste Teil der Körperzellen teilt sich und wenn, dann nur selten und/oder langsam. Stark proliferativ sind nur wenige Gewebe wie z.B. Epithelien. Ist zu wenig Energie für die Proliferation vorhanden, nutzt die Zelle ihre Regulationsmechanismen zur Reorganisation (Gesundung und Aufräumen) der Zelle (Rubinsztein et al., 2011). Die in Kapitel 1.2.1 beschriebenen Mechanismen können so Ursache und Erklärung für ein Phänomen sein, dass bereits seit Jahrzehnten bekannt ist – die Kalorien-Restriktion.

Die dauerhafte Reduktion der Gesamtenergiemenge um bis zu 30% - also ca. das gleiche „Mehr an Energie“, das eine Tumorzelle benötigt (1.2.2) - bei Erhalt der Aufnahme von

essentiellen Nährstoffen, hat eine stark lebensverlängernde und gesundheitsfördernde Wirkung und verlangsamt den Alterungsprozess (Ball et al., 1947). Die positive Wirkung der Kalorien-Restriktion auf den Organismus lässt sich in speziesübergreifenden Studien nachweisen. So profitieren Hefen und Invertebraten von *Drosophila* bis hin zu Wirbeltieren wie Nagern, Rhesusaffen und dem Menschen allesamt von einer verminderten Kalorienaufnahme. Dabei ist das auffälligste Phänomen die Verlängerung der absoluten Lebensdauer bei Hefen, *C. elegans* und *Drosophila* um das 3-fache sowie bei Nagern um 30-50% (Abb. 4). Des Weiteren kann die altersbedingte Morbidität sowie das Auftreten von altersassoziierten Erkrankungen bei Primaten und Menschen reduziert werden (Escobar et al., 2019).



**Abb. 4: Einfluss der Kalorien-Restriktion auf eukaryotische Zellen und Organismen (modifiziert nach (Escobar et al., 2019))**

Die Darstellung zeigt die positiven Effekte einer Kalorien-Restriktion auf die Lebensspanne verschiedener Organismen von der Hefe bis hin zum Menschen.

Bei der Kalorien-Restriktion greifen eine Vielzahl der bereits beschriebenen Mechanismen (Abb. 1). LKB1 und somit AMPK werden aktiviert, mTOR hemmende Prozesse werden gefördert und mTOR selbst wird gehemmt (Gillespie et al., 2016). Es kommt außerdem zu sinkenden IGF-1-Spiegeln und zur Aktivierung von SIRT1 und der AMPK, was zur vermehrten Autophagie führt (Wei et al., 2017, Escobar et al., 2019). Allerdings ist die Protein-/Aminosäure-Restriktion mittlerweile eine etablierte Alternative zur Kalorien-Restriktion.

### **1.4.1 Die Protein-/Aminosäure-Restriktion**

Wie bereits erwähnt, misst die Zelle permanent den energetischen Zustand an unterschiedlichen Stellen. Dabei spielen nicht nur reine Energiereserven wie Glukose, ATP oder NADH eine Rolle, sondern auch Metaboliten, denen Schlüsselrollen im allgemeinen Stoffwechsel und - vor allen Dingen - hinsichtlich der Proliferation zukommen. Eine dieser besonderen Positionen nehmen in der Zelle die Aminosäuren ein. Während Kohlenhydrate und Lipide rein prozentual im Wesentlichen der Energiegewinnung dienen, stellen die Aminosäuren die substantielle Basis dar. Auf der einen Seite liefern sie wesentliche Grundgerüste für einen Großteil elementarer Stoffwechselwege wie für den Zitratzyklus und den Harnstoffzyklus aber auch durch die Bildung von Kohlenhydratvorstufen in Form von Ketosäuren (z.B. Oxalacetat) in der Glukoneogenese bis hin zu den Nukleinsäuren (Röhm, 2014a). Außerdem bilden sie den Hauptbestandteil der Zellmasse in Form von Strukturproteinen, z.B. des Zytoskeletts sowie der Katalysatoren des Lebens – den Enzymen. Aus diesem Grund misst die Zelle den Aminosäuren eine ebenso große Bedeutung zu wie den reinen Energieäquivalenten ATP und NADH.

Deswegen spielt neben der Aufnahme der Gesamtkalorienzahl also vor allem die Menge der aufgenommenen Proteine eine wichtige Rolle. Das eine Protein-Restriktion sich durchaus gravierend auf den Stoffwechsel auswirkt, zeigt die Publikation von Levine und Kollegen aus dem Jahr 2014. Hierbei bezogen sich die Autoren auf Daten der zu diesem Zeitpunkt bereits 15 Jahre zurückliegenden NHANES III–Studie aus den USA, bei der eine Patientengruppe im Alter von 50-65 Jahren sehr detaillierte Aufzeichnungen über ihr Essverhalten machte, sowie regelmäßig medizinischen Vorsorgeuntersuchungen unterzogen wurde. Im Anschluss wurden sie anhand der Daten aufgrund der aufgenommenen Proteine in drei Gruppen unterteilt. So nahm die erste Gruppe über 20% Proteine auf, die zweite 10-19% und die letzte nahm nur noch eine Proteinmenge von weniger als 10%, gemessen an der Gesamtkalorienmenge, zu sich. Anschließend wurden die Vitalität und Anamnesen der Probanden zum aktuellen Zeitpunkt ausgewertet und in Korrelation zum Proteinverbrauch gesetzt. Das Ergebnis, die Gruppe mit dem höchsten Proteinkonsum hatte ein 75% erhöhtes Mortalitätsrisiko, ein vierfach



erhöhtes Risiko an Krebs und ein fünffach erhöhtes Risiko an Diabetes zu sterben (Levine et al., 2014).

Dabei ist es nicht zwingend notwendig, die Gesamtmenge an Proteinen zu senken. Es hat sich bereits die Restriktion einzelner ausgesuchter Aminosäuren als ausreichend erweisen, um die gleichen Ergebnisse wie bei einer Kalorien- bzw. Protein-Restriktion zu erzielen (Sugimura et al., 1959). Als Standard hat sich hier die Methionin-Restriktion (MetR) etabliert (Cavuoto and Fenech, 2012, Ables et al., 2016). Das Met so effektiv ist, lässt sich auf seine herausragende Rolle gegenüber den anderen Aminosäuren zurückführen. So spielt es unter anderem eine bedeutende Rolle bei der Proteinbiosynthese, der Methylierung von DNA und der Polyaminbiosynthese. Humane Körperzellen sind bei exogener MetR in der Lage, die an sich essentielle Aminosäure beispielsweise durch die Umsetzung von Homocystein oder mittels SAM zu regenerieren. Tumorzellen haben diese Fähigkeit oft durch Deletion, Polymorphismen oder veränderte Genexpression verloren und sind somit auf eine durchgehende extrazelluläre Versorgung dieser Aminosäure angewiesen (Cavuoto and Fenech, 2012, Chaturvedi et al., 2018). MetR senkt z.B. bei Nagern den IGF-1-, Insulin-, Glukose- und Schilddrüsenhormon-Spiegel, was alles einen positiven Einfluss auf die Lebensspanne zeigt. Außerdem wird eine antidiabetische Wirkung durch eine Verbesserung des Leber-, Fett- und Glukosestoffwechsels erzielt. Hierbei spielt vor allem die MetR-induzierte Senkung der hepatischen Triglyceride, von Leptin und IGF-1 eine Rolle. Zusätzlich wurde im selben Zusammenhang eine Erhöhung der Werte von Adiponectin und FGF-21 festgestellt (Ables et al., 2016). Außerdem wiesen die Tiere, die einer MetR unterzogen wurden einen wesentlich geringeren Körperfettanteil und eine verlängerte Lebensspanne, trotz gleicher Kalorienzufuhr, auf (Malloy et al., 2006).

Beim Vergleich der Auswirkungen von Kalorien- bzw. Protein-Restriktion mit der Signalkaskade aus Abb. 1 fällt auf, dass die Regulationsmechanismen aktiv werden, die in Kapitel 1.2.1 beschrieben wurden. Diese haben meist zur Folge, dass es zu einer Hemmung von mTOR kommt. Wie Abb. 2 zeigt, ist mTOR das Schlüsselmolekül, das die Schaltstelle zwischen einem LEM und einem High-Energy-Metabolismus (HEM) darstellt. Wie oben beschrieben kommt es dabei meist zu einer verminderten Proliferationsrate

und je nach Zelltyp zu gesundheitsfördernder Wirkung, was sich sogar in einer verminderten Krebsrate äußern kann. Daraus ergibt sich die Überlegung, dass der LEM im Allgemeinen – induziert durch die Hemmung von mTOR – einen potenziellen Therapieansatz gegen Krebs darstellen könnte.

### **1.4.2 Der Low-Energy-Metabolismus als potenzieller Therapieansatz gegen Krebs**

Eine Kalorien- bzw. Protein-Restriktion kann also einen LEM induzieren und hat erheblichen Einfluss auf den Stoffwechsel einer Zelle. Doch eignet sich ein LEM auch für einen gezielten Einsatz in der Tumorthherapie?

Die herausragende Rolle von Met im Stoffwechsel wurde im vorherigen Kapitel (1.4.1) bereits beschrieben. Die Met-Abhängigkeit von Tumoren, also der „absolute Bedarf“ an Met, ist ein wichtiger Stoffwechselunterschied zu normalen Zellen (Cellarier et al., 2003). So könnte sich diese „absolute“ Met-Abhängigkeit in der Krebstherapie zu Nutze gemacht werden.

Eine synergistische Wirkung einer Met-freien Diät konnte bereits in klinischen Studien belegt werden (Gao et al., 2019, Cellarier et al., 2003) und auch ein vermindertes Tumorwachstum in Tiermodellen konnte durch eine MetR verzeichnet werden (Hens et al., 2016, Komninou et al., 2006). So hemmte eine MetR das Tumolvolumen bei Ratten *in vivo* beispielsweise bereits enorm (Hoshiya et al., 1995). In Experimenten mit Hunden konnten auch bei einer parenteralen Vollnahrung ohne Met über mehrere Wochen keine nennenswerten Nebenwirkungen verzeichnet werden (Goseki and Nagahama, 2001), was bei einem tatsächlichen Einsatz der MetR in der Tumorthherapie äußerst relevant ist. Auch die L-Methionase, ein bakterielles Enzym das Met spaltet, könnte sich zu Nutze gemacht werden. Die Verabreichung des rekombinanten Enzyms simuliert im Grunde eine MetR und konnte menschlichen Tumorarten bei Nagern bereits entgegenwirken. Zusätzlich zeigten sich beim Menschen präklinisch keine Toxizitäten (Tan et al., 1997).

Die Publikation von Levine und Kollegen ist in diesem Zusammenhang ebenfalls von Bedeutung (Levine et al., 2014). Hier wurde der Fragestellung nachgegangen, inwiefern sich eine Protein-Restriktion auf das Tumorwachstum bzw. dessen Metastasenbildung auswirken kann. Hierfür wurden zwei *in vivo* Versuche mit Mäusen durchgeführt. Im

ersten Versuch wurden zwei Gruppen an Mäusen auf eine Protein-Diät gesetzt, sprich die Nahrung der ersten Gruppe betrug 18% Proteine gemessen an der Gesamtkalorienzahl, die der zweiten 4-7%. Zusätzlich wurden beiden Gruppen 20.000 murine Melanomzellen mit dem Ergebnis appliziert, dass 39 Tage später die Mäuse, die viel Protein zu sich genommen hatten, 78% größere Tumore hatten als ihre Vergleichsgruppe.

Ein weiterer Versuch wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt mit dem einzigen Unterschied, dass hier 20.000 murine Brustkrebszellen statt Melanomzellen appliziert wurden. Das erstaunliche Ergebnis war, dass nach 18 Tagen 30% der Mäuse mit niedriger Proteinzufuhr immer noch keine Tumore aufwiesen und nach Abschluss des Experiments nach 39 Tagen ebenfalls nur 80% der Gruppe Tumore zeigten, während in der Gruppe mit 18% Proteinzufuhr 100% der Mäuse Tumore ausgebildet haben.

Auch anderweitig konnten bereits ähnliche Ergebnisse erzielt werden. So zeigte eine protein-restriktive Ernährung hemmende Wirkung auf das Wachstum von menschlichen Prostata- und Brustkrebszellen bei xenogen transplantierten Mäusen. Eine 7% Protein-Diät hemmte das Prostatakrebswachstum um 70% und das Brustkrebswachstum um 56% verglichen mit der isokalorischen Diät der Kontrollgruppe, die 21% Proteine enthielt. Außerdem wurden Korrelationen unter anderem von niedrigeren IGF-1-Spiegeln im Serum sowie eine Herunterregulation von mTOR festgestellt. Neben der Proteinquantität spielte auch die Qualität eine Rolle. So sank das Tumorgewicht bei 20% Pflanzenprotein verglichen mit 20% tierischem Milchprotein um ca. 37% (Fontana et al., 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Protein-Restriktion bzw. eine MetR einen effektiven Ansatz in der Krebstherapie darstellt und dieses Feld in Zukunft sicherlich weitere Studien nach sich ziehen wird. Es stellt sich jedoch die Frage, ob es nicht möglich wäre, selbige Ergebnisse nur durch ein einziges Medikament oder Nahrungsergänzungsmittel erzielen zu können, ohne die gesamte Ernährung umstellen zu müssen. Wobei eine strenge Diät während einer laufenden Krebstherapie den Patienten auch zusätzlich belasten könnte. Nahrungsergänzungsmittel wie NAD+ oder das weltweit am meisten eingesetzte Diabetes-Typ-II-Medikament Metformin sind

vielversprechende Kandidaten hierfür. Im Folgenden soll besprochen werden, wie sie jene vorgeschaltete mTOR-Kaskade beeinflussen und so ähnliche Wirkung wie eine Kalorien- bzw. Protein/Aminosäure-Restriktion erzielen könnten.

### **1.5 Kalorien-Restriktions-Mimetika**

Altersbedingte Komorbiditäten wie v.a. Krebs lassen sich bisher durch eine Kalorien-Restriktion effektiv hinauszögern. Wäre es nicht aber ein großer Fortschritt, selbige Wirkung nur durch ein einziges Medikament erzielen zu können?

Durch diese Fragestellung rücken die sogenannten Kalorien-Restriktions-Mimetika (CRM) in den Fokus. Diese beschreiben im Grunde Medikamente bzw. Nahrungsergänzungsmittel, die eine Kalorien-Restriktion nachahmen können. So könnte die gesundheitsfördernde Wirkung einer kalorienrestriktiven Diät ganz ohne eine Nahrungsumstellung erzielt werden. Auch eine kombinierte Gabe im Zusammenhang einer Krebstherapie wäre so vorstellbar. CRM wie beispielsweise Metformin, zeigten bereits in klinischen Studien ein krebsminderndes Risiko (Dong et al., 2012, Erices et al., 2013, Iliopoulos et al., 2011). Auch in Tiermodellen verlängerte die orale Gabe die Lebensspanne und auch beim Menschen wirkten sie neben den krebsmindernden Effekten gegen das metabolische Syndrom und kognitive sowie kardiovaskuläre Störungen (Mattison et al., 2017). So könnte in Zukunft eine prophylaktische Gabe von kombinierten CRM wie Resveratol, Spermidin, Metformin und Rapamycin mit zusätzlichem intermittierenden Fasten ein längeres, gesünderes Leben ermöglichen und altersbedingte Komorbiditäten eventuell gar nicht erst entstehen lassen (Madeo et al., 2019).

Im Zusammenhang mit HNSCC wurden ebenfalls schon *in vivo* Studien durchgeführt. So verbessert Metformin in den Dosen von 2000 mg, 2550 mg und 3000 mg täglich in Kombination mit Cisplatin und Radiatio in Folge einer Krebstherapie die 5-Jahres-Überlebensrate der Tumorpatienten (Gulati et al., 2020). Es wirkt außerdem sowohl direkt als auch indirekt auf die Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms und verhindert zusätzlich das Fortschreiten und die weitere Entartung prämaligener Läsionen und Präkanzerosen (Wu et al., 2019, Vitale-Cross et al., 2012).

Metformin zählt zu der Stoffklasse der Biguaniden. Es wirkt hauptsächlich in den Mitochondrien, wo es eine spezifische Hemmung des Atmungskettenkomplexes 1 induziert. Hierdurch kommt es zu einer Senkung der Energieladung und der hepatische Glukoseausstoß wird verringert (Foretz et al., 2014). Der exakte molekulare Wirkmechanismus dieses Medikaments ist bislang noch nicht vollständig geklärt.

Eine Übersicht über die Wirkungsweise und das Potenzial Metformins wurde 2016 von Novelle und Kollegen in dem Review „Metformin: a hopeful promise in aging research“ beschrieben (Novelle et al., 2016). Demnach führt die verminderte zelluläre Atmung durch die durch Metformin ausgelöste Hemmung der mitochondrialen Komplex-1-Aktivität zu einem verminderten ATP-Spiegel (El-Mir et al., 2000, Foretz et al., 2014). Dadurch steigt das AMP/ATP- sowie das ADP/ATP-Verhältnis an und stimuliert die AMPK (Stephenne et al., 2011). Metformin kann die AMPK allerdings auch unabhängig von sich ändernden AMP-, ADP- und ATP-Spiegeln aktivieren (Hawley et al., 2002). Zusätzlich stimuliert Metformin auch die Autophagie über die AMPK-vermittelte Hemmung von mTOR (Del Barco et al., 2011, Dowling et al., 2007, Morales and Morris, 2015).

Ein anderes potenzielles CRM, ist NAD<sup>+</sup>. Dieses ist als Nahrungsergänzungsmittel bereits verbreitet und kann de novo aus Tryptophan, Asparagin und Niacin synthetisiert werden oder durch den NAD-Salvage-Pathway recycelt werden. Hier wird aus Nicotinamid (NAM) durch die NAM-Phosphoribosyltransferase Nicotinamid Mononukleotid (NMN) synthetisiert, welches wiederum durch die NMN-Adenyltransferase 1,2 oder 3 in NAD<sup>+</sup> umgewandelt werden kann (Bonkowski and Sinclair, 2016).

Eine erhöhte Konzentration in der Zelle kann ebenfalls gesundheitsfördernde Wirkung zeigen, wobei seine Wirkung vor allem auf der Aktivierung der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Sirtuine beruht. Diese durch NAD<sup>+</sup> hochregulierte SIRT1-Aktivität führt zur Deacetylierung der LKB1, welche über die AMPK wiederum mTOR hemmt (Kap. 1.2.1.). In dem im „Cell Metabolism“ publizierten Review „Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The *In Vivo* Evidence“ von 2018 erläuterten L. Rajman, D. A. Sinclair und Kollegen unter anderem das Potenzial von NAD<sup>+</sup> als Ansatz gegen Krebs (Rajman et al., 2018). Demnach steigt durch hohe NAD<sup>+</sup>-Level die mitochondriale Atmung und die

Glykolyse geht zurück, was dem Warburg-Metabolismus entgegenwirkt. Außerdem steigt die Aktivität von SIRT 1 und 6, welche beide in der Lage sind, Tumore zu hemmen. Befürchtungen, dass hohe NAD<sup>+</sup>-Werte durch vermehrte DNA-Reparatur die Angiogenese fördern und damit das Gedeihen von Krebszellen fördern könnten, konnten mit Hilfe von Langzeitstudien mit Wildtyp-Mäusen nicht bestätigt werden (Rajman et al., 2018). Eine Erhöhung des mitochondrialen NAD<sup>+</sup>-Spiegels kann das Wachstum von Glioblastomzellen indes sogar hemmen (Son et al., 2017).

Als letztes soll noch auf Spermidin eingegangen werden. Spermidin gehört genau wie Putrescin und Spermin zu der Gruppe der Polyamine. Diese kommen natürlicherweise in allen eukaryotischen Organismen vor und sind für Wachstum, Differenzierung und Überleben eukaryotischer Zellen erforderlich (Battaglia et al., 2014). Um die Bedeutung von intrazellulärem Spermidin für den zellulären Stoffwechsel zu verstehen, ist es wichtig sich dessen Bildungsweg anzuschauen. Spermidin wird durch die Spermidin-Synthase aus decarboxyliertem SAM und Putrescin synthetisiert. Da SAM durch Met und ATP synthetisiert wird, ist die intrazelluläre Spermidinkonzentration im Grunde ein indirekter Met-Indikator, sprich viel intrazelluläres Spermidin deutet auf einen HEM hin. Diese These deckt sich mit der Tatsache, dass der Gesamt-Polyamin-Gehalt in proliferierenden Zellen rasch ansteigt und im Gegenzug ein Mangel an Polyaminen mit einem Rückgang der Zellproliferation einhergeht (Battaglia et al., 2014). Zusätzlich binden Polyamine an die RNA (Ribonukleinsäure), was zu strukturellen Veränderungen führt, die Proteinsynthese steigert und effizienter macht (Igarashi and Kashiwagi, 2010). Das heißt übersetzt, dass eine hohe intrazelluläre Polyaminkonzentration die Proteinsynthese fördert. Dies zeigte auch eine Studie von Mandal und Kollegen aus dem Jahr 2013, indem sie herausfanden, dass ein Mangel an intrazellulärem Spermidin und Spermin durch Überexpression eines polyaminabbauenden Enzyms zur Hemmung der Protein-Synthese und zum Wachstumsstillstand in HeLa-Zellen führte (Mandal et al., 2013). Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass eine extrazelluläre Aufnahme von Spermidin - beispielsweise durch die Nahrung - ähnlich gesundheitsfördernde Wirkung wie eine Kalorien-Restriktion zeigt. So hat eine gesteigerte Spermidinaufnahme schützende Wirkung gegen Krebs, Stoffwechselerkrankungen, Herzkrankheiten und

Neurodegeneration zur Folge, was vermutlich auf die Aktivierung der Autophagie zurückzuführen ist (Madeo et al., 2018). So vermittelte auch eine durch Spermidin aktivierte Autophagie dosisabhängig einen Proliferationsstopp und eine vermehrte Apoptose bei HeLa-Zellen (Chen et al., 2018). Es zeigt sich also, dass Spermidin sowohl als intrazellulärer Indikator für einen möglichen LEM als auch durch orale Supplementation als CRM von Interesse ist und diesem Molekül weiterhin Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte.

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss unterschiedlicher Restriktions-Formen bzw. Supplementierungen auf die humanen Krebszelllinien HeLa und HaCaT, die murine Fibroblastenzelllinie L929 sowie die HNSCC-Zelllinien (FaDu, Detroit 562, SCC9 und SCC25) zu untersuchen. Hierfür wurden je nach Versuch ausgesuchte Zelllinien unter Glukose-Restriktion bzw. MetR gesetzt und/oder mit den CRM Metformin und NAD<sup>+</sup> versetzt. Hierdurch sollte *in vitro* der Frage nachgegangen werden, ob sich die jeweiligen Ansätze grundsätzlich als Therapieformen gegen Krebs eignen könnten und ob ein LEM induziert werden kann. Für Vorversuche wurden die Zelllinien L929 und/oder HeLa verwendet, da diese sich in vorherigen Arbeiten als sehr responsiv erwiesen haben. Anhand der Ergebnisse sollte die Grundlage für zukünftige Versuche mit HNSCC-Zellen geschaffen werden.

Erstens sollte das Potenzial einer Glukose-Restriktion auf HeLa- und L929-Zellen in Proliferationsstudien untersucht werden. Da diese nur Auskunft über die relative Zellzahl geben, wurden zusätzlich mikroskopische Analysen durchgeführt, um Aufschluss über Vitalität und Morphologie zu erhalten. Da Krebszellen Resistenzen gegen Medikamente und Todesliganden ausbilden können (Kap. 3.1.3), sollte außerdem der Frage nachgegangen werden, ob sich diese unter Glukose-Restriktion ändern. Hierfür wurden weitere Proliferationsstudien unter Glukose-Restriktion mit zusätzlicher Supplementierung von Cisplatin, Fas-Ligand (FasL) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF $\alpha$ ) durchgeführt.

Da die im vorherigen Kapitel erläuterten CRM Metformin und NAD<sup>+</sup> potenziell sehr vielversprechende Wirkstoffe darstellen, um eine Kalorien-Restriktion zu induzieren,

ohne die Ernährung grundlegend ändern zu müssen, wurden sie ebenfalls auf ihr Potenzial untersucht, die Proliferation zu hemmen. Weil der Schwerpunkt der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie auf der Bekämpfung des Plattenepithelkarzinoms liegt, wurden hier neben den drei Vergleichslinien auch die HNSCC-Linien analysiert.

Zuletzt sollten die Folgen einer MetR auf die Genexpression der murinen L929-Linie und den Metabolismus der humanen HeLa-Linie untersucht werden. Hierfür wurden die L929-Zellen mittels MetR einem LEM ausgesetzt und anschließend mittels real-time RT-PCR eine Analyse der veränderten Genexpression durchgeführt.

Im Hauptfokus stand die massenspektrometrische Untersuchung der Zelllinie HeLa unter MetR, wodurch eine genaue Analyse des veränderten Zellmetabolismus möglich werden sollte. Ziel der Arbeit war es, ein humanes Modellsystem mit der Cervixkarzinomzelllinie HeLa zu etablieren und ein typisches Profil für MetR in Form eines metabolen Fingerabdrucks zu erstellen. Dafür wurden über 150 Metaboliten und Moleküle aus verschiedenen Stoffwechselwegen, wie dem Aminosäurestoffwechsel, dem Harnstoffzyklus, dem Zitratzyklus, dem Kohlenhydratstoffwechsel, der Glykolyse und Stoffgruppen wie die der Pyrimidine und Purine sowie einzelnen Co-Faktoren analysiert. Mithilfe dieser Ergebnisse sollte zusätzlich ein kleiner „Footprint“ aus wenigen Metaboliten erstellt werden, der spezifisch für HeLa unter MetR codiert. Anschließend sollte der metabolische Fingerabdruck der vorangegangenen Arbeit mit L929-Zellen, der unter gleichen Bedingungen stattgefunden hat (Schmitz et al., 2021) dem der Zelllinie HeLa gegenübergestellt und verglichen werden. So sollte überprüft werden, ob dieser metabolische Finger- bzw. Fußabdruck erstens auf eine humane Zelllinie übertragbar ist und zweitens, ob es überhaupt möglich ist, durch eine MetR einen LEM in Krebszellen zu induzieren.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Die HNSCC-Zelllinien wurden von ATCC (deutscher Distributor LGC Standards GmbH (Wesel)) erworben. Es wurden die vier Zelllinien FaDu, Detroit, SCC9 und SCC25 verwendet. Hinzu kamen HeLa, eine humane Zelllinie, welche aus einem Cervixkarzinom etabliert wurde, sowie HaCaT, eine immortalisierte humane Keratinozytenzelllinie. Für Analysen des murinen Stoffwechsels wurde die Fibroblastenzelllinie L929 verwendet. HeLa, HaCaT und L929 wurden vom Leibniz Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) erworben.

Zelllinie	Ursprungsgewebe
FaDu	Pharynxkarzinom
Detroit562	Pharynxkarzinommetastase
SCC9	Zungenkarzinom
SCC25	Zungenkarzinom
HeLa	Zervixkarzinom
HaCaT	Keratinozyt
L929	Mausfibroblast

Tab. 1: Verwendete Zelllinien

#### 2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Medium/Zusatz	Hersteller
DMEM/F-12, 1:1 Mix	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1x)	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
FBS (Fetal Bovine Serum)	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
D-Glukose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
MEM Alpha Medium	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt

Medium/Zusatz	Hersteller
Penicillin-Streptomycin (Penicillin 10.000 units/ml; Streptomycin 10.000 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
RPMI-Medium 1640	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
RPMI-Medium 1640 ohne Glukose	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
RPMI-Medium 1640 ohne Methionin	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Hydrocortison (≥ 98%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
TNF $\alpha$	Expression im Labor (Schmitz et al., 2021)
FasL	Expression im Labor (Schmitz et al., 2021)
Cisplatin	Merck KGAA, Darmstadt
Metformin	Selleckchem, USA
NAD+	Carl Roth, Karlsruhe

Tab. 2: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

Zusatz	zugegeben zu	Konzentration [g/L]	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [mM]
(D)-Glukose	RPMI-Medium 1640 ohne Glukose	2	180,0	11,1
(D)-Glukose	RPMI-Medium 1640 ohne Glukose	1,26	180,0	7
(D)-Glukose	RPMI-Medium 1640 ohne Glukose	0,72	180,0	4
Metformin gelöst in aqua dest.	Vollmedium (zellspezifisch)	1,29	129,16	10
NAD+ gelöst in aqua dest.	Vollmedium (zellspezifisch)	9,95	663,43	15

Tab. 3: Übersicht über die Konzentrationen selbst angemischter Medien

### 2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Reagenz	Hersteller
BSA (Rinderserumalbumin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kristallviolett	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol (99,8%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Vertrieb Merck GmbH Darmstadt
Trypan Blue stain 0,4%	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Trypsin (0,5%) / EDTA (0,2%) - Solution (10x)	Biochrom GmbH, Berlin
Ethanol absolut	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen

Tab. 4: Reagenzien und Chemikalien

### 2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe, HLC	DITABIS Digital Biomedical Imaging Systems AG, Pforzheim
Einkanalpipetten, Eppendorf Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
Präzisionswaage, WB 0200024	KERN & SOHN GmbH, Dürrewangen
Gefrierschrank, 7084 311-00	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Inkubator, Heracell™ 150i	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Kühlschrank, LCv 4010 MediLine	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Magnetrührer, MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mehrkanalpipetten, Eppendorf Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Kamera, Leica EC3	Leica Camera AG, Hamburg
Photometer, Tecan Infinite® F50	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Pipettierhelfer, Accujet®pro	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim
Pumpe, Vacusafe	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal
Sterilbank, Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Vortexgerät, Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., Karlsruhe
Wärmebad, GFL 1083	GFL GmbH, Burgwedel
Wasserbad, MB-5	Julabo GmbH, Seelbach
Zellmikroskop, Olympus CK40	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg
Zellmikroskop, EVOS XL	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Zellzähler, EVE™ Automated Cell Counter	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Zentrifuge, 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
UV/VIS Spektralphotometer & Fluorometer, Nanodrop®	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
CFX Connect™ Real-Time PCR DetectionSystem, Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories, Inc.

**Tab. 5: Verwendete Geräte**

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-Well-Platten, Nunc™ Zellkultur-Multischalen	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
96-Well-Platten, Nunc™ MikroWell™, 96-Well-Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
EVE™ Cell Counting Slides	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Gewebekulturschalen	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glaspipetten	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Petrischalen, Nunc™	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Pipettenspitze, epT.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße, SafeSeal	Sarstedt AG und Co. KG, Nürnbrecht
Spritzenvorsatzfilter	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Zellkulturflaschen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellschaber, Cell Scraper	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Klebefolien, Bio-Rad Microseal® „B“ seal	Bio-Rad Laboratories, United Kingdom
96-Well-Platte, Multiplate™ 96-Well Unskirted PCR Plates, Thin-Wall Polypropylene	Bio-Rad Laboratories, United Kingdom
Mini-Spin-Säulen, RNeasy Mini Spin Column	Qiagen GmbH, Hilden
Sammelröhrchen, Collection Tubes (2 ml)	Qiagen GmbH, Hilden

Tab. 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

### 2.1.6 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Kristallviolettlösung	0,5 g Kristallviolett 100 ml Methanol 400 ml dH <sub>2</sub> O
Tris/EDTA (TE) - Puffer	1,211 g/L Tris (A1086) 0,372 g/L EDTA-Na <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O pH: 8,0 ± 0,1 (20°C; eingestellt mit HCL)

Tab. 7: Verwendete Lösungen und Puffer

## 2.1.7 Kits und Assays

Kit/Assay	Hersteller
RNeasy® Mini Kit (250), QuantiTect® <ul style="list-style-type: none"> <li>- RLT Puffer (Lösungspuffer)</li> <li>- RPE Puffer (Waschpuffer)</li> <li>- RW1 Puffer (Waschpuffer)</li> <li>- RNase-freies Wasser</li> </ul>	Qiagen GmbH, Hilden
Reverse Transcription Kit (200) <ul style="list-style-type: none"> <li>- RT Puffer</li> <li>- Reverse Transkriptase</li> <li>- RT Primer-Mix</li> <li>- gDNA, WipeOut Puffer</li> <li>- RNase-freies Wasser</li> </ul>	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect® Primer Assay for SYBR®Green real-time RT-PCR	Qiagen GmbH, Hilden

Tab. 8: Verwendete Kits und Assays

Primer-Liste: (QuantiTect® Primer Assay for SYBR®Green real-time RT-PCR der Firma Qiagen)	Produktnummer
Aktin-beta (Act-β)	QT00095242
Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (Map1lc3b)	QT00112875
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh)	QT00199388
Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (Hprt)	QT00166768
Fibroblast growth factor 21 (FGF-21)	QT00132202
Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)	QT00154469
Tumor protein p53 (p53)	QT00101906

Tabelle 9: Primer-Liste des QuantiTect® Primer Assays

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in dem für sie geeigneten Medium, welchem jeweils 10% fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin-Streptomycin (P/S) zugesetzt wurde, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Das Medium für SCC9 und SCC25 wurde außerdem zusätzlich mit 5 µl Hydrocortison versehen. Alle drei bis vier Tage fand - vor dem

Passagieren - unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung eine optische Proliferations- und Kontaminationskontrolle statt. Alle weiteren Arbeiten fanden unter der Sterilbank statt. Anschließend wurde das Medium mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt, die Zellen mit jeweils 10 ml PBS gewaschen und erneut abgesaugt, um tote Zellen und Bestandteile zu entfernen. Nun wurden 3 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung in die Flasche pipettiert, um die Zellen zu lösen. Trypsin hat je nach Zelllinie eine Einwirkzeit von 10-30 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden 7 ml entsprechendes Medium hinzugegeben und eine dem Splitverhältnis entsprechende Menge in die Flasche zurückgeführt. In Tab. 10 findet sich eine Übersicht über die Splitverhältnisse der einzelnen Zelllinien.

Zelllinie	Splitverhältnis
FaDu	1:5
Detroit562	1:3
SCC9	1:2,5
SCC25	1:2
HeLa	1:10
HaCaT	1:4
L929	1:10

Tab. 10: Split-Verhältnisse

### 2.2.2 Zellzählung

Die Zellzahl wurden mittels Trypanblau-Färbung im Zellzähler EVE™ bestimmt. Hierzu wurden je 20 µl der Zellsuspension und Trypanblau in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und gemischt. 10 µl der gefärbten Zellsuspension wurden in eine Zählkammer der EVE Counting Slides überführt. Trypanblau ist ein saurer, anionischer Farbstoff, welcher an die basischen Zellproteine bindet und die Zellmembran vitaler Zellen nicht durchdringt. Infolgedessen erscheinen vitale Zellen auf dem Display des Gerätes innen hell, während abgestorbene Zellen und Zellbestandteile durchweg dunkelblau dargestellt werden. Die Zellzählung wird durch den EVE-Counter automatisiert durchgeführt.

### **2.2.3 Zytotoxizitätsassay (ZytoTox)**

Zur Bestimmung der relativen Zellzahl wurde die Kristallviolett-Färbung verwendet. Diese beruht auf dem Verbund der sauren DNA in der Zelle mit dem basischen Farbstoff Kristallviolett (N-Hexamethyl-Pararosanilin). Dazu wurden 10.000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Anschließend erfolgte nach 24 Stunden die Abnahme des Überstandes und die Stimulation der Zellen mit dem entsprechenden Wirkstoff bzw. neudefinierten Medienzusätzen. Nach drei bis fünf Tagen im Brutschrank wurden die Überstände verworfen und die zu messenden Wells mit je 50  $\mu$ l Kristallviolett-Farbstoff versehen. Nach zehnmütiger Einwirkzeit wurde die 96-Well-Platte in destilliertem Wasser mindestens drei Mal gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Vor der Messung wurden 100  $\mu$ l Methanol in jedes Well pipettiert und anschließend die Absorption im Mikroplatten-Reader Tecan Infinite F50 photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

#### *2.2.3.1 Verdünnungsreihen*

10.000 Zellen pro Well wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden in die erste Reihe 200  $\mu$ l Medium mit der entsprechenden Startkonzentration des Wirkstoffs (z.B. 10 mM Metformin bzw. 15 mM NAD<sup>+</sup>) vorgelegt. In jedes weitere Well wurden 100  $\mu$ l normales Medium vorgelegt. Zur Erstellung einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe wurden 100  $\mu$ l aus der ersten Reihe entnommen und jeweils in die darauffolgende Reihe pipettiert und kurz, durch vorsichtiges auf- und ab pipettieren, gemischt. Dann wieder 100  $\mu$ l in die nächste Reihe überführt usw. Die letzte Reihe diente als Kontrolle und wurde nicht verdünnt. Die Werte wurden als Triplikate angelegt. Die Auswertung erfolgte in der Regel nach 72 Stunden. Zur Veranschaulichung wurde in Abb. 5 ein vereinfachtes Schema dargestellt.

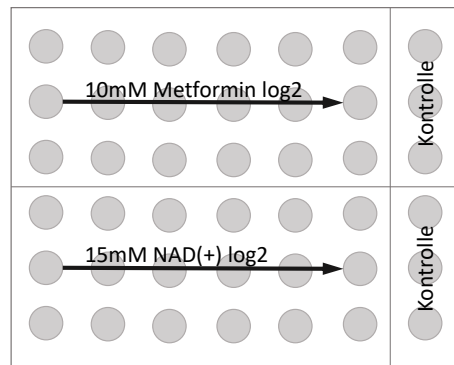


Abb. 5: schematische Darstellung einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe mit Metformin und NAD<sup>+</sup>

Analog zu den oben beschriebenen Verdünnungsreihen wurden die Analysen auch mit der jeweiligen Startkonzentration von 11,1 mM D-Glukose nach 72 und 120 Stunden sowie den Liganden 200  $\mu$ M Cisplatin, 500 ng/ml TNF und 250 ng/ml FasL und 4 mM (bei L929) bzw. 7 mM (bei HeLa) glukosehaltigem Medium nach 72 Stunden an den Zelllinien L929 und HeLa in einer log<sub>2</sub>-Verdünnung durchgeführt.

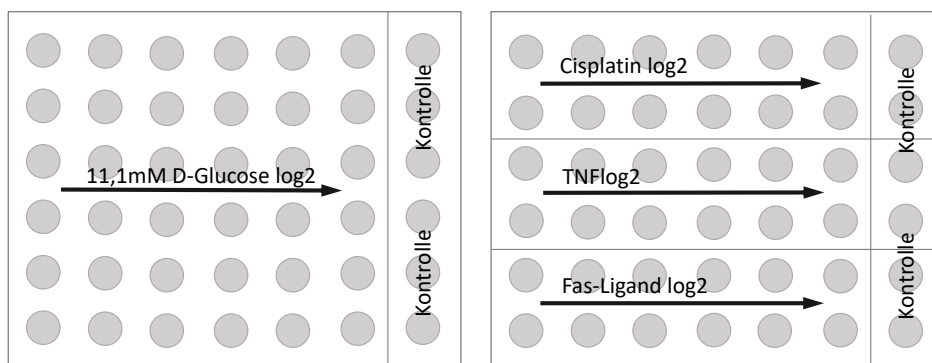


Abb. 6: Schematische Darstellung der log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihen der Zelllinien HeLa und L929 mit D-Glukose, Cisplatin, TNF und Fas-Ligand.

### 2.2.3.2 Datenanalyse und Auswertung der Zytotoxizitätsassays

Die gemessenen Extinktionswerte wurden mit dem Programm Excel ausgewertet. Zuerst wurde der Backgroundwert ( $BG_{E595} \approx 0,16$ ), der einmalig als Mittelwert durch die Messung einer Platte mit 100  $\mu$ l Methanol pro Well ermittelt wurde, von den Rohwerten subtrahiert. Anschließend wurde der Mittelwert (MW) gebildet. Mit dem Wert der Kontrollgruppe, der als 100% definiert wurde, war es nun möglich, mit folgender Formel die relative Zellzahl in Prozent zu bestimmen:



$$\left( \frac{MW_{(\text{stimulierte Zellen})E595}}{MW_{(\text{Kontrolle})E595}} \right) \times 100 = \text{RZ (relative Zellzahl) in Prozent}$$

Auch die Standardabweichung (STBW) wurde mit Hilfe des Formelgenerators des Programms Excel generiert und lässt sich folgendermaßen in eine relative Standardabweichung umrechnen:

$$\left( \frac{STABW_{(\text{Wert } x)}}{MW_{(\text{Wert } x)}} \right) \times RZ_{(\text{Wert } x)} = STABW_{(RZ)} \text{ in Prozent}$$

#### 2.2.4 Real Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Um die Regulationen von ausgesuchten Zielgenen nach vorangegangener MetR beurteilen zu können, wurde die Methode der RT-PCR angewandt. Hierfür wurden zunächst 100.000 Zellen/Well (bei Stimulationen bis zu drei Tagen) und 50.000 Zellen/Well (bei Stimulationen länger als drei Tage) der Zelllinie L929 in einer 6-Well-Platte ausgesät und nach 24 h mit Met-freiem Medium bzw. die Kontrollgruppe mit Vollmedium stimuliert. Nach je einem, drei und fünf Tagen wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, mit je 2 ml PBS pro Well die Zellen gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt, in Eppendorfgefäße überführt und bei Raumtemperatur drei Minuten lang bei 2000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet zur RNA-Isolierung weiterverwendet.

##### 2.2.4.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy®MiniKits der Firma Qiagen. Um das Pellet zu lysieren wurden 350 µl RTL-Puffer hinzugegeben und mit einer Einwegspritze, die mit einer 20G Kanüle bestückt war, dreimal die genomische DNA geschert. Dann wurden zu jeder Probe 350 µl Ethanol (70%) hinzugegeben, kurz gemischt und anschließend die gesamte Suspension in RNeasy Mini-Spin-Säulen übertragen und 30 s bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Nun wurde die Säule auf ein 2 ml Sammelröhrchen umgesetzt und 700 µl RW1 Waschpuffer hinzugegeben und erneut auf höchstmöglicher Stufe 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss aus dem Sammelröhrchen

wurde verworfen und 500 µl RPE Waschpuffer auf die Membran pipettiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Um die RNA von der Membran zu lösen, wurde in einem letzten Schritt 40 µl RNA-freies Wasser auf die Säule gegeben und in ein Eppendorfgefäß eine Minute lang bei 1200 rpm zentrifugiert. Im Nano Drop 2000 c Spektrophotometer konnte nun die genaue RNA-Konzentration und deren Qualität photometrisch bei 260 nm bestimmt werden. Die Konzentration basierte auf einem Absorptionskoeffizienten von 260 nm genormt auf eine Schichtdicke von 10 mm [A<sub>260</sub>] und dem spezifischen Extinktionskoeffizienten für RNA von 40. Daraus ergab sich folgende Formel zur Berechnung der Konzentration [C].

$$c [ng/\mu l] = A_{260} \times 40 [ng * cm/\mu l]$$

Für die Durchführung der Messung wurden zunächst 1-2 µl einer Blindprobe aus destilliertem Wasser auf den Probensteller pipettiert und anschließend eine „Blank“-Messung durchgeführt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde die gleiche Menge der RNA-Probe auf den Probensteller pipettiert und die Messung gestartet. Das Gerät bestimmte zusätzlich den Absorptionskoeffizienten bei 280 nm auf 10 mm Schichtdicke genormt [A<sub>280</sub>]. Daraus wurde das Verhältnis des Absorptionskoeffizienten bei 260 nm zu 280 nm bestimmt (260/280), welches Auskunft über den Reinheitsgrad der RNA gab. Dieses Verhältnis lag bei „reiner“ RNA bei etwa 2. War es deutlich niedriger, wies dies auf eine Verunreinigung der Probe durch Protein, Phenol oder Ähnliches hin.

### 2.2.4.2 *cDNA-Synthese und real time RT-PCR*

Um die RT-PCR durchführen zu können, war es notwendig, die isolierte RNA in Copy-DNA (cDNA) umzuwandeln. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Reverse Transcription Kit QuantiTect® der Firma Qiagen. Pro Ansatz wurden je 1 µg RNA in 12 µl wässriger Lösung mit 2 µl gDNA WipeOut-Puffer versetzt, um die genomische DNA zu eliminieren. Der Master-Mix enthielt pro Ansatz je 1 µl reverse Transkriptase, 4 µl reverse Transkriptase-Puffer und 1 µl Primer Mix. 6 µl des Master-Mix wurden zu jeder Probe hinzu pipettiert und diese anschließend für 15 Minuten bei 42°C erwärmt. Die reverse

Transkriptase wurde durch Inkubation für 3 min in einem 95°C heißen Wasserbad Hitzeinaktiviert.

Für die darauffolgende PCR wurde die gewonnene cDNA mit je 780 µl TE-Puffer (pH 8,0) verdünnt und anschließend pro Ansatz 11 µl der verdünnten cDNA zusammen mit 12,5 µl des SYBR®Green-Master-Mix in je ein Well einer 96-Well-Platte (Multiplate™ 96-Well Unskirted PCR Plates, Thin-Wall Polypropylene) pipettiert. Pro Well wurden 1,5 µl eines bestimmten Primers aus dem QuantiTect® Primer Assay hinzugegeben. Es wurden drei verschiedene Standards (Act-β, Gapdh und Hprt) gewählt, um eventuelle Regulationen einzelner Standards zu erkennen und damit etwaige Fehler in den Ergebnissen zu minimieren. Die Aufteilung erfolgte in Triplets nach Folgendem Pipettierschema:

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Met(+)		<b>IGF-1</b>			<b>FGF-21</b>		<b>Map1-LC3B</b>				<b>p53</b>	
B	Met(-)												
C	Met(+)		<b>Act-β</b>			<b>Gap-DH</b>		<b>Hprt</b>					
D	Met(-)												

Abb. 7: Typisches Pipettierschema einer RT-PCR

Vor dem Starten der PCR wurde die 96-Well-Platte mit einer Bio-Rad Microseal® Folie abgeklebt, um die Ansätze vor Verdunstung zu schützen. Die DNA-Amplifizierung und Target-Messung erfolgte mittels Bio-Rad CFX Connect™ Real-Time System. Hierbei dient die cDNA als Ausgangsmatrize und es erfolgte eine Detektion und Quantifizierung der Amplifikationsprodukte durch SybrGreen in Echtzeit. Das Protokoll der Zyklen des Bio-Rad CFX Manager 3.1 verlief wie folgt:

1. Schritt: 95°C, 15:00 Minuten
2. Schritt: 94°C, 0:15 Minuten
3. Schritt: 54°C, 0:30 Minuten
4. Schritt: 72°C, 0:30 Minuten

Die Schritte 2-4 wurden insgesamt 39 Mal wiederholt. Nach dem Ende jedes Zyklus wurde SybrGreen gemessen.

### 2.2.4.3 Analyse der Genexpression mittels delta-delta-Ct-Methode

Die Analyse der mittels real time RT-PCR erhobenen Daten erfolgte durch die delta-delta-Ct-Methode. Der sog. Ct-Wert (Cycle Treshold, Schwellenwertzyklus) stellt den Schnittpunkt zwischen der Amplifikationskurve und der Schwellenwertlinie dar. Der Assay beruht auf der Messung der Zunahme des Fluoreszenzsignals und ist exponentiell proportional zu der während des Zyklus generierten DNA (Nolan et al., 2006). Die erhobenen Daten wurden zunächst in eine Excel-Tabelle exportiert. Die einzelnen Werte wurden von dem gemessenen Standard abgezogen und anschließend der Wert der stimulierten Proben von dem der nicht stimulierten abgezogen. Diese Differenz wurde mit der Basis 2 potenziert und zeigt so eine eventuelle Regulation des untersuchten Zielgens an.

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct^{Standard} - Ct^{Probe} \\ \Delta\Delta Ct &= Ct^{Met(-)} - Ct^{Met(+)} \\ \text{Faktor} &= 2^{\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

Die Fehlerberechnung erfolgte nach Livak und Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001). Hierfür wurde mit Hilfe des Formelgenerators des Programms Excel die STBW durch die Bildung der MW der Ct-Werte pro Platte erstellt und der Fehler aus den neu gebildeten Varianzen wie folgt berechnet:

$$Fehler = \sqrt{(STBW_{Probe})^2 + (STBW_{Standard})^2}$$

Der so berechnete Fehler wurde dann ebenfalls mit dem Faktor 2 potenziert, wodurch sich eine Fehlerrange ergab:

$$\begin{aligned}\Delta\Delta Ct \pm Fehler \\ 2^{\Delta\Delta Ct} (2^{(\Delta\Delta Ct - Fehler)} \text{ bis } 2^{(\Delta\Delta Ct + Fehler)})\end{aligned}$$

Eine große Range deutet auf ein ungenaues Ergebnis hin, wohingegen eine kleine Range ein genaueres Ergebnis widerspiegelt.

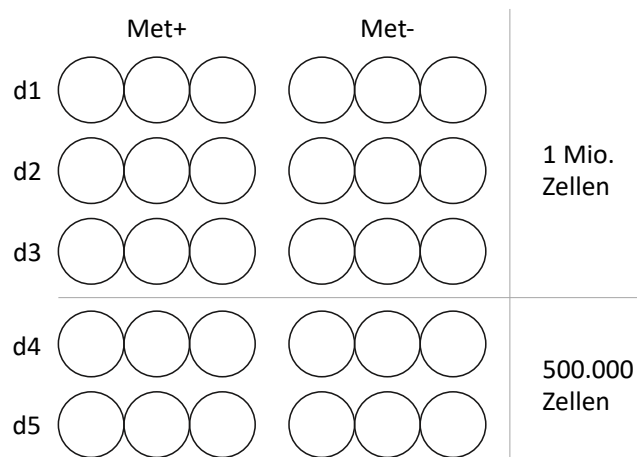
### 2.2.5 Mikroskopie zur optischen Analyse der Zellvitalität

Eine einfache Möglichkeit, die Vitalität einer Zelle zu überprüfen, ist die optische Kontrolle mit einem Mikroskop. Dabei wird im Wesentlichen darauf geachtet, dass die Zellen nicht abgestorben sind und sich von der Zellkulturschale gelöst haben, bzw. die

Zellmorphologie einen intakten Eindruck vermittelt. Hierfür wurden 300.000 Zellen HeLa oder L929 pro Well in je einer 6-Well-Platte ausgesät und diese nach 24 h jeweils mit unterschiedlichen D-Glukose-Konzentrationen von 0-11,1 mM stimuliert. Anschließend wurden mit Hilfe des Zellmikroskops Olympus CK40 ein Kontrollbild vor Stimulation sowie Bilder nach drei und fünf Tagen nach Stimulation in 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Diese wurden mit Hilfe des Programms „Fotos“ (Version 3.0 für Mac) in Bezug auf Farbe, Kontrast und Ausschnitt zur besseren Darstellung bearbeitet.

### 2.2.6 Metabolom-Analyse mittels Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie

Bei der Metabolom-Analyse handelt es sich um eine hochauflösende Massenspektrometrie. Hierfür wurden die Zelllinien mit Met-freiem als auch mit Vollmedium über einen Zeitraum von fünf aufeinanderfolgenden Tagen stimuliert. Ziel des Versuchs war es, Veränderungen im Metaboliten-Haushalt sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zu analysieren. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abb. 8 dargestellt und wird im Folgenden zusammen mit der Durchführung genauer erläutert:



**Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die massenspektrometrische Untersuchung.**

Dargestellt ist der Versuchsaufbau, wobei je einer der Kreise für eine 15 cm große Maxipetrischale steht. Der Metabolismus der Tumorzelllinie HeLa wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen HeLa für die Tage eins bis drei in 15 cm Petrischalen beziehungsweise  $5 \times 10^5$  Zellen für die Tage vier und fünf ausgesät. Die reduzierte Anzahl ausgesäter Zellen sollte ein Überwachsen der Zellen in der Kontrolle an Tag vier und fünf verhindern. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Met-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Met-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst je Schale 1 ml Medium abgenommen. Im Anschluss wurde für jede Probe ein Zellpellet mit jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet. Die Zellpellets sowie die Medienüberstände wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Pro Messung konnten mit Hilfe der Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS) mehr als 150 verschiedene Metaboliten unterschiedlicher Stoffwechselwege wie des Kohlenhydratstoffwechsels, des Zitratzyklus und des Harnstoffzyklus analysiert werden. Hinzu kamen Moleküle wie ATP, ADP und NADH (Übersicht in Tab. 11).

Der Versuch wurde über fünf aufeinanderfolgende Tage durchgeführt. Zunächst wurden  $1 \times 10^6$  Zellen HeLa für die Tage eins bis drei beziehungsweise  $5 \times 10^5$  Zellen HeLa für die Tage vier und fünf in 20 ml Medium je 15 cm Petrischalen ausgesät. Die unterschiedliche Anzahl ausgesäter Zellen sollte ein Überwachsen der Kontrollen an Tag vier und fünf verhindern. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Vollmedium oder Met-freiem Medium stimuliert. An jedem Tag wurde pro Petrischale ein Zellpellet mit genau einer Millionen Zellen erstellt sowie 1 ml des jeweiligen Mediums abgenommen und jeweils in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Bildung der Zellpellets wurde das Medium zunächst abgesaugt und anschließend die Zellen mit 10 ml PBS gespült. Nun wurde je 2,5 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben und die Zellen für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Jede Petrischale wurde mit dem jeweiligen Medium auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und die Zellsuspension in einen 50 ml Falcon™ gegeben. Es folgte eine 3-4-malige Zellzählung analog des in Absatz 2.2.2 beschriebenen Vorgangs. Der errechnete Mittelwert der vorhandenen Zellzahl pro Milliliter wurde benötigt, um das Volumen der Zellsuspension zu berechnen, in der sich genau eine Millionen Zellen befanden. Diese wurde in 10 ml Falcons™ pipettiert und anschließend fünf Minuten lang bei 21°C und einer Umdrehungszahl von 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 1,5 ml abgesaugt, das Pellet erneut im Restüberstand gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dieses wurde erneut nach dem gleichen Schema bei größtmöglicher Umdrehungszahl zentrifugiert. Nach Absaugung des gesamten Überstandes wurden die Zellpellets bei -20°C weggefroren. Als Referenzwert in der Datenanalyse wurde vorher ebenfalls je ein Milliliter der verwendeten Ausgangsmedien entnommen.

Aminosäuren	Aminosäurederivate	Harnstoffzyklus
Alanine	Dimethylglycin	Carbamoylphosphate
Arginine	Choline	Citrulline
Asparagine	Indoxylacetat	ArgSucc
Aspartate	Glycerate	Ornithine
Cysteine	GABA	N-Acetylornithine
Glutamate	Methylthioribose-Phosphat	
Glutamine	Glutamylcysteine	
Glycine	Phenylpyruvate	<b>Zitratzyklus</b>
Histidine	Creatine	Citrate
Isoleucine	Creatinine	Aconitate
Leucine	Carnitine	a-Ketoglutarate
Lysine	Spermidine	Succinate
Methionine	CoA	Fumarate
Phenylalanine	3-Methyl-2-oxobutanoate	Malate
Proline	3-Methyl-2-oxopentanoate	
Serine	4-Methyl-2-oxopentanoate	
Threonine	5-Hydroxytryptophane	<b>Kohlenhydratstoffwechsel</b>
Tryptophan	3-Hydroxykynurenine	Hexosephosphate
Tyrosine	Kynurenine	Fructose-1,6-bisphosphate
Valine	N-Formylkynurenine	Dihydroxyacetone phosphate
	Putrescine	3-Phosphoglycerate
	N-AC-Putrescine	Phosphoenolpyruvate
<b>Lipide</b>	Homocysteine	Pyruvate
Acetoacetate	Homoserine	Lactate
Mevalonate	S-Adenosylhomocysteine	6-Phosphogluconate
Mevalonate-5-phosphate	S-Adenosylmethionine (SAM)	Gluconate
	Decarboxy-SAM	Pentose-5-phosphate
	Sarcosine	Erythrose-4-phosphate
	Cystine	Deoxyribose-phosphate
	GSH	Glucosamine
	GSSG	Glucosamine-phosphate
	Taurine	Glycerol-3-phosphate
		N-Acetylneuraminic acid
	PRPP	

Pyrimidine	Purine	Co-Faktoren
Carbamoylaspartate	Inosin	Biotin
Dihydroorotate	dInosin	FMN
Orotate	IMP	FMNH <sub>2</sub>
Uracil	Adenin	FAD
Uridin	Adenosin	FADH <sub>2</sub>
UMP	AMP	Nicotinamide
UDP	ADP	mNAM
UTP	ATP	NAD <sup>+</sup>
dUridine	cAMP	NADH
dUMP	dAMP	NADP <sup>+</sup>
dUDP	dADP	NADPH
dUTP	dATP	Dephospho-CoA
UDP-Glc	Guanin	N <sup>10</sup> -Formyl-FH <sub>4</sub>
UDP-Glucuronate	Guanosin	N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methylene-FH <sub>4</sub>
Cytosin	GMP	N <sup>5</sup> -Methyl-FH <sub>4</sub>
Cytidin	GDP	Thiamine (+)
CMP	GTP	Thiamine phosphate (+)
CDP	Hypoxanthin	Pantothenate
CTP	Xanthin	Pyridoxine
dCytidine	Xanthosin	
dCMP	Xanthurenic Acid	
dCDP	XMP	
dCTP	FAICAR	
Thymin	Adenylsuccinate	
TPP (+)	dAdenosin	
dThymidine		
dTMP		
dTDP		
dTTP		

Tab. 11: Übersicht der in der Massenspektrometrie untersuchten Metaboliten

Die massenspektrometrische Datenanalyse sowie die Auswertung der Primärdaten erfolgte von Herrn Dr. Werner Schmitz und soll im Folgenden kurz erläutert werden:



Rohdatenanalyse und Zahlenwertbildung (in Kurzform):

Die massenspektrometrischen Analysen wurden unter proliferativen Bedingungen in drei voneinander unabhängigen Experimenten jeweils in Triplets zu 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h durchgeführt. Die Metaboliten wurden in Zellpellets und entsprechenden Überständen (Medien) unter Met-haltigen und Met-freien Bedingungen quantifiziert (insgesamt 12 Proben pro Zeitpunkt). Die resultierenden Peakflächen wurden gegen Lamivudin als externen Standard normalisiert. Daraus wurde für jedes Triplikat der Mittelwert einschließlich der STABW berechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte in Prozent umgerechnet. Bei den Werten der Medien wurde die Kontrollmessung des verwendeten Ausgangsmediums als 100% definiert. Für die Zellpellets wurde der höchste gemessene Wert in jeder Testreihe eines Metaboliten als 100 % definiert. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus den drei Experimenten in den einzelnen Tabellen zusammengefasst (Schmitz et al., 2021). Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse auf natürliche Zahlen gerundet und als Heat-Map dargestellt. Der entsprechende Farbcode ist unter jeder Tabelle einzeln angegeben. Alle Werte und die für die einzelnen Tabellen verwendeten Datensätze sind im Appendix angehängt.

### **2.2.7 Statistik**

Jeder Versuch wurde mindestens drei Mal in voneinander unabhängigen Ansätzen wiederholt (n=3) und die erhobenen Daten in Excel Microsoft® (Mac, Version 16.33) gesammelt, ausgewertet und analysiert. Die Grafiken wurden anschließend mit dem Programm GraphPadPrism (Windows, Version 8.3.0) erstellt.

### 3 Ergebnisse

Die Energie und die Masse innerhalb einer Zelle stellen einen grundlegenden Ansatz dar, die Proliferation von neoplastischen Zellen zu beeinflussen. Neben vielen anderen Möglichkeiten bieten sich vor allen Dingen die Glukose als bedeutender Energieträger und die Aminosäuren als wesentlicher Baustein der Zellmasse an (Hosios et al., 2016, Tanner and Rutter, 2016, Vander Heiden et al., 2009).

Aus Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe war bekannt, dass durch die MetR bei ausgesuchten murinen (L929) und humanen Zelllinien (HeLa und HaCaT) sowie humane Zelllinien des Plattenepithelkarzinoms die Proliferation inhibiert wird und die Zellen wahrscheinlich in einen LEM übergehen. Zusätzlich konnte für die murine Zelllinie L929 ein spezifisches metabolisches Profil mit Hilfe der Massenspektrometrie (LC/MS) für die MetR erstellt werden (Schmitz et al., 2021).

In dieser Arbeit sollte in ersten Versuchen analysiert werden, welchen Einfluss die Glukose-Restriktion und die Verwendung der CRM NAD<sup>+</sup> und Metformin auf die Proliferation ausgesuchter Zelllinien haben und ob die erwähnten Metaboliten und Wirkstoffe alternativ zur MetR verwendet werden können, um potenziell einen LEM zu induzieren. Zusätzlich sollten die Auswirkungen der MetR auf das metabolische Profil der humanen Zelllinie HeLa untersucht und die Ergebnisse mit den erstellten Profilen der murinen Zelllinie L929 verglichen werden, um eventuelle Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zwischen den humanen und den murinen Profilen zu identifizieren.

#### 3.1 Glukose-Restriktion

Wie bereits beschrieben ermöglicht es die Energie-Restriktion, z.B. in Form der Kalorien- oder Aminosäuren-Restriktion, Zellen in einen LEM zu versetzen, der unter anderem die Proliferation der Zellen - mTOR vermittelt - inhibiert. Dem gegenüber steht als Ansatz in der Tumorthherapie sehr häufig die Limitierung der Glukose.

Wesentliches Argument ist der bereits beschriebene Warburg-Effekt, der zu einem höheren Grundumsatz an Glukose über die Laktat-synthetisierende anaerobe Glykolyse führt. Welche Vorteile die einzelnen Therapieansätze im Vergleich haben, ist dabei schwierig zu ermitteln. Vor allen Dingen mangelt es an aussagekräftigen Arbeiten, die

die einzelnen Formen der Restriktion direkt miteinander vergleichen, um so quantitative oder zumindest qualitative Unterschiede in den einzelnen Ansätzen zu eruieren.

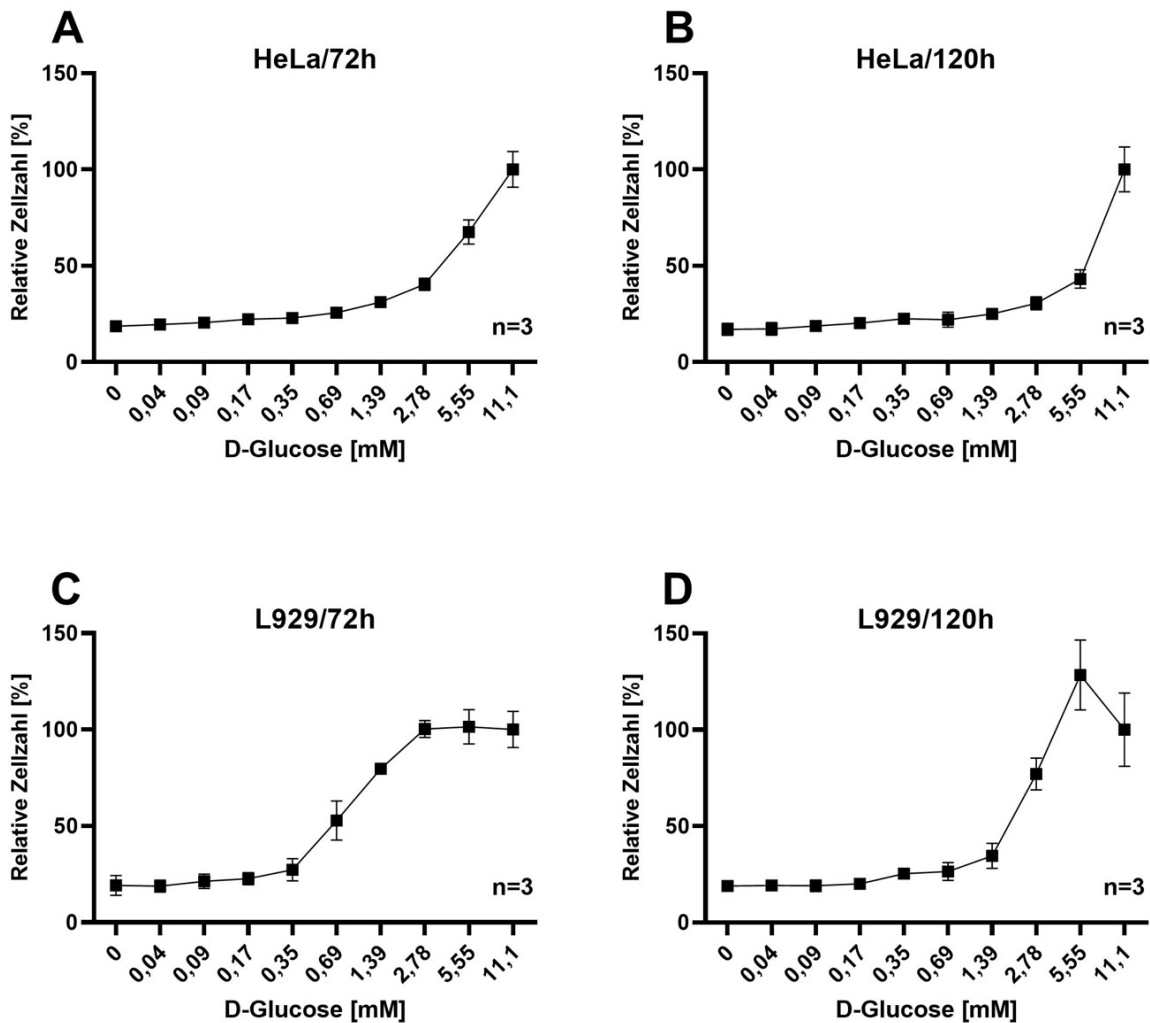
Das Proliferationsverhalten verschiedener Zelllinien unter MetR wurde in der Arbeitsgruppe bereits analysiert (Koderer, 2021). Um auf Dauer die einzelnen Ansätze miteinander vergleichen zu können, sollten in dieser Arbeit erste Versuche durchgeführt werden, inwiefern sich die Glukose-Restriktion auf die Zelllinie HeLa (human) und L929 (murin) auswirkt.

### **3.1.1 Proliferationsverhalten der Zelllinien HeLa und L929 unter Glukose-Restriktion über einen Zeitraum von drei und fünf Tagen**

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Auswirkung der Glukose-Restriktion auf das proliferative Verhalten der Zelllinien L929 und HeLa untersucht. Dazu wurden im 96-Well Format jeweils 10.000 Zellen pro Well ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einer Log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe der Glukose beginnend mit 11,1 mM für 72 h bzw. 120 h inkubiert. Als Negativkontrolle diente Medium ohne Glukose. Ausgewertet wurde der Versuch durch die Bestimmung der relativen Zellzahl mittels ZytoTox (2.2.3).

Beide Zelllinien reagierten sensitiv auf die Glukose-Restriktion. Bis zu einer Glukosekonzentration von 0,17 mM fiel die relative Zellzahl ab (Abb. 9). Im direkten Vergleich der Zellen nach drei und fünf Tagen wurde deutlich, dass nach drei Tagen bei beiden Zelllinien auch bei halbierter Glukosekonzentration noch ein Großteil der Zellen vital war (Abb. 9A - HeLa: 5,55 mM D-Glukose: 67,5% ± 6,3; Abb. 9C - L929: 5,55 mM D-Glukose: 101,4% ± 8,9). Hinzu kommt, dass die murine Zelllinie L929 eine Glukose-Restriktion sehr viel besser tolerierte als ihr humanes Gegenüber. So konnte bei einer Glukosekonzentration von 0,69 mM nach 72 h noch eine relative Zellzahl von 52,8% ± 10,2 der L929 Zellen verzeichnet werden, während die Zellen der Linie HeLa unter gleichen Umständen nur 26% ± 2 der Gesamtzellzahl aufwiesen.

Zusätzlich nahm die Zellzahl mit der Zeit ab. Wurden die Zellen dem oben beschriebenen Milieu von 0,69 mM über einen Zeitraum von fünf Tagen ausgesetzt, so konnten bei L929 nur noch  $26,4\% \pm 4,6$  der Zellen nachgewiesen werden, während die Zelllinie HeLa nun Werte von  $22\% \pm 3,9$  aufwies (Abb. 9).



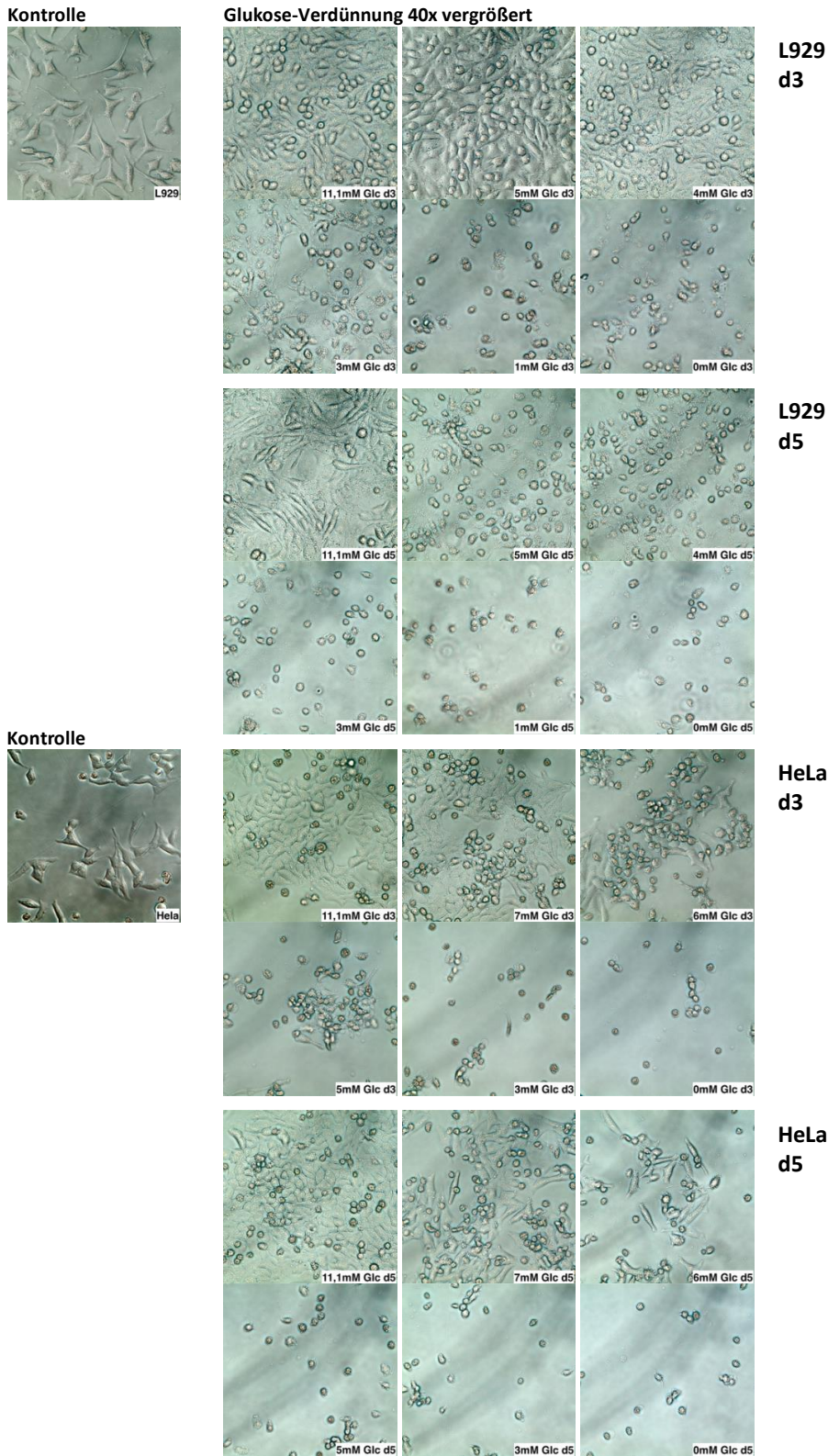
**Abb. 9: A-D Proliferationsverhalten der Zelllinien L929 und HeLa nach Glukose-Restriktion.**

Die Proliferation der Zelllinien HeLa und L929 wurde unter abnehmender Glukosekonzentration über einen Zeitraum von drei und fünf Tagen analysiert. Die Zellen wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit einer log2-Verdünnungsreihe ausgehend von Glukose-Vollmedium (11,1 mM) bis hin zu Glukose-freiem Medium stimuliert. Die Auswertung erfolgte mittels ZytoTox (Kap. 2.2.3). Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und die gemittelten Ergebnisse in den Abbildungen zusammengefasst.

Da beim ZytoTox nur die relative Zellzahl bestimmt werden konnte und es nicht klar ersichtlich war, ob nur ein Proliferationsstopp oder ein Zelltod stattgefunden hatte und auch über Zellstruktur und Morphologie keine Aussage getroffen werden konnte, wurden die Zellen zusätzlich mittels Mikroskopie analysiert.

### **3.1.2 Mikroskopische Analyse der Zellmorphologie der Zelllinien HeLa und L929 über einen Zeitraum von drei und fünf Tagen unter Glukose-Restriktion**

Die mikroskopischen Analysen der Zelllinien HeLa und L929 unter Glukose-Restriktion wurden analog zu den Proliferationsstudien nach drei und fünf Tagen durchgeführt (Kap. 3.1.1). Hierfür wurden je 300.000 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die L929 Zellen mit den Glukosekonzentrationen 0 mM, 1 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM und 11,1 mM und die HeLa Zellen mit 0 mM, 3 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM und 11,1 mM Glukose im Medium inkubiert und nach 72 h bzw. 120 h unter 40-facher Vergrößerung analysiert. Als Kontrolle diente eine Aufnahme der Zellen einen Tag nach der Aussaat im Vollmedium vor der Stimulation (Abb. 10).



**Abb. 10: Mikroskopische Analyse der Zellen unter Glukose-Restriktion (40-fache Vergrößerung).**

Für die mikroskopische Darstellung der Zellen unter Glukose-Restriktion wurden in 6-Well-Platten 300.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen stimuliert und für drei bzw. fünf Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung dargestellt. Die Abbildungen links (Kontrolle) zeigen die Zellen einen Tag nach dem Aussäen vor der Stimulation und dienen als Referenz für die Zellmorphologie.

Die Ergebnisse der Mikroskopie (Abb. 10) stehen in Einklang mit den Ergebnissen des ZytoTox. Fehlte dem Medium Glukose, so reduzierte sich die Zellzahl, wahrscheinlich durch Zelltod. Dies erkennt man an dem zunehmenden Fehlen adhärierter und ausgeweiteter Zellen mit normaler Zellmorphologie. L929 und HeLa haben in der Regel einen eher spindelförmigen Phänotyp. Stellt sich die Zelle in Form einer Kugel und abgerundet vom Boden gelöst dar, ist sie entweder im Begriff sich zu teilen oder tot. Auch in den Aufnahmen zeigte sich deutlich, dass die murinen Fibroblasten eine Glukose-Restriktion deutlich besser verkrafteten als die humane Tumorzelllinie HeLa. Sehr deutlich wurde das ab 3 mM Glukose. Während die L929 nach drei Tagen bei einer Konzentration von 3 mM Glukose noch vital waren, wiesen die von der Petrischale abgelösten kugeligen Zellen der HeLa-Linie auf vermehrten Zelltod hin. Auch die Dauer der Glukose-Restriktion hatte Einfluss auf das Überleben. So zeigten z.B. die Zellen L929 nach fünf Tagen im Medium mit 3 mM Glukose keine erkennbaren Vitalitätszeichen.

Auffällig war auch die veränderte Morphologie der Zellen bei stetiger Glukose-Restriktion. So wiesen HeLa Zellen nach drei Tagen in 6 mM glukosehaltigem Medium eine veränderte Form auf. Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigten sich die Zellen abgerundet und teilweise aus ihrem Zellverbund gelöst. Das gleiche Phänomen zeigte sich bei L929. Hier änderte sich die Morphologie bei ca. 3 mM Glukose nach drei Tagen im Medium. Die für Fibroblasten typischen Fibroblasten-Fortsätze verschwanden, die Zellen erschienen kugelig und vom Zellverbund gelöst.

Wie aus den ZytoTox-Versuchen und den Mikroskopie-Studien erkennbar, hat nicht nur der komplette Entzug der Glukose, sondern auch schon die Senkung der Konzentration Einfluss auf die Vitalität und Morphologie der Zellen. Aus diesem Grund sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob die Glukosekonzentration sich auf die biologische Aktivität von Apoptose-/Nekrose-induzierenden Faktoren und Zytostatika auswirkt.

### **3.1.3 Einfluss der Glukose-Restriktion auf die biologische Aktivität von TNF $\alpha$ , FasL und Cisplatin in den Zelllinien L929 und HeLa**

Um zu zeigen, ob die Zelllinien HeLa und L929 unter Glukose-Restriktion verändert auf ausgesuchte Liganden und Reagenzien reagieren, wurden in nachfolgenden Versuchen die beiden Liganden aus der TNF-Familie (TNF $\alpha$  und Fas-L) und das Zytostatikum Cisplatin getestet. TNF $\alpha$  gehört zu den Zytokinen und löst im Körper u.a. zahlreiche Entzündungsprozesse aus, kann aber auch kontextabhängig die Apoptose induzieren bzw. wie bei L929 die Nekroptose (Ye et al., 2011). FasL ist ein sog. Todesligand. Die Interaktion von FasL und Fas-Rezeptor (FasR) kann ebenfalls zur Apoptose führen. Da aus früheren Arbeiten bekannt ist, dass bei einigen Krebszelllinien Resistenzen gegen TNF $\alpha$  und FasL vorhanden sind (Reed, 1999), bilden Liganden der TNF-Familie einen guten Ansatz, um zu prüfen, ob besagte Resistenzen durch Glukose-Restriktion beeinflusst werden.

Bei Cisplatin handelt es sich um ein Zytostatikum, das vor allem in der Chemotherapie zum Einsatz kommt. Es hemmt die DNA-Replikation durch Quervernetzung der DNA-Einzelstränge und hemmt so die Zellteilung stark proliferierender Zellen. Da Cisplatin in der Krebstherapie bereits erfolgreich Anwendung findet, wurde es hier verwendet, um zu zeigen, ob eine Glukose-Restriktion die Wirkung auf proliferative Zellen verändert.

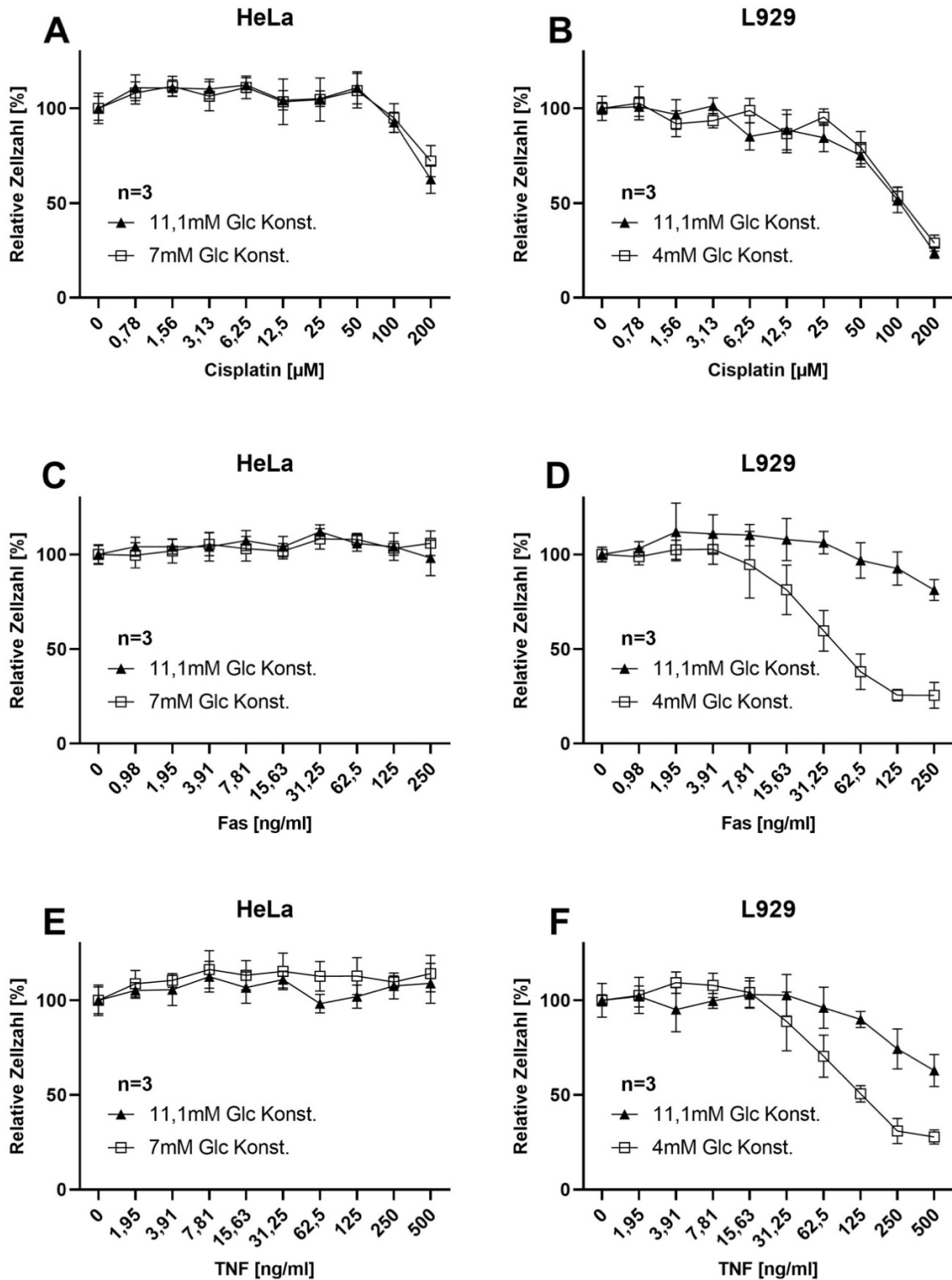
Im Versuch wurden die Zelllinien HeLa und L929 über einen Zeitraum von drei Tagen mit TNF $\alpha$ , FasL und Cisplatin stimuliert. Als Read-Out diente der ZytoTox, also die Bestimmung der relativen Zellzahl nach 72 h. Damit in den Versuchen im Wesentlichen die biologische Aktivität der genannten Faktoren gemessen wurde, wurde auf Grund der Ergebnisse der Mikroskopie-Studien eine Glukosekonzentrationen gewählt, die über den Untersuchungszeitraum von 72 h nur einen geringen Einfluss auf die Gesamtzellzahl hatte. So ergab sich für HeLa ein Wert von 7 mM und für L929 ein Wert von 4 mM Glukose (siehe Abb. 10).



Für den Versuch wurden auf einer 96-Well-Platte zwei log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihen des jeweiligen Liganden angesetzt, die eine in Normalmedium mit einer Glukosekonzentration von 11,1 mM und die zweite unter der ausgewählten reduzierten Glukosekonzentration. In der graphischen Auswertung werden die beiden Kurven nach der prozentualen Normierung in einem Diagramm dargestellt. Der Einfluss der Glukosereduktion ist dann durch eine evtl. Verschiebung der Kurve erkennbar.

Sowohl bei HeLa als auch bei L929 wirkte Cisplatin erst in höheren Konzentrationen, ab 100 bzw. 50 µM. Die Zellen verhielten sich unter allen Glukosekonditionen identisch, d.h. die Glukose-Restriktion hatte keinen signifikanten Einfluss auf die biologische Aktivität.

Zu dem gleichen Ergebnis kam man für die Liganden TNF $\alpha$  und FasL in HeLa. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass keiner der genannten Faktoren aus der TNF $\alpha$ -Familie einen Einfluss auf die Zellzahl hat, selbst bei hohen Konzentrationen. Auch die Glukose-Restriktion führt zu keiner Sensitivierung der Zellen z.B. in Form der Apoptose/Nekrose. Ganz anders verhielt es sich bei L929. Hier führten beide Faktoren zu einer signifikanten Sensitivierung und Abnahme der relativen Zellzahl. Im Vollmedium sank die relative Zellzahl bei einer FasL-Konzentration von 250 ng/ml auf  $81,2\% \pm 5,5$ , während die relative Zellzahl unter 4 mM Glukose-Restriktion bereits bei 31,25 ng/ml Fas-Ligand um knapp  $40\% \pm 6,8$  sank. Ein ähnliches Bild zeigte sich nach Zugabe von TNF $\alpha$ . Bei einer Konzentration von 125 ng/ml sank die relative Zellzahl auf  $49,3\% \pm 4,9$ , während die Zellen im Vollmedium erst ab einer Konzentration von 500 ng/ml Werte von  $62,9\% \pm 8,4$  erreichten (Abb. 11).



**Abb. 11: Proliferationsverhalten der Zelllinien HeLa und L929 unter Normalbedingungen und Glukose-Restriktion in Kombination mit den Faktoren Cisplatin, FasL und TNF $\alpha$ .**

Die Proliferation wurde über einen Zeitraum von drei Tagen analysiert. Es wurden log-2-Verdünnungsreihen entweder mit Cisplatin, FasL oder TNF $\alpha$  angesetzt, jeweils in Vollmedium oder unter Glukose-Restriktion (L929 mit 4mM Glukose (Glc) HeLa mit 7mM Glukose (Glc)). Die Auswertung erfolgte nach 72 h mittels ZytoTox (Kap. 2.2.3). Die Ergebnisse wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und die gemittelten Ergebnisse in den Abbildungen zusammengefasst.

### **3.2 Analyse der CRM Metformin und NAD<sup>+</sup>**

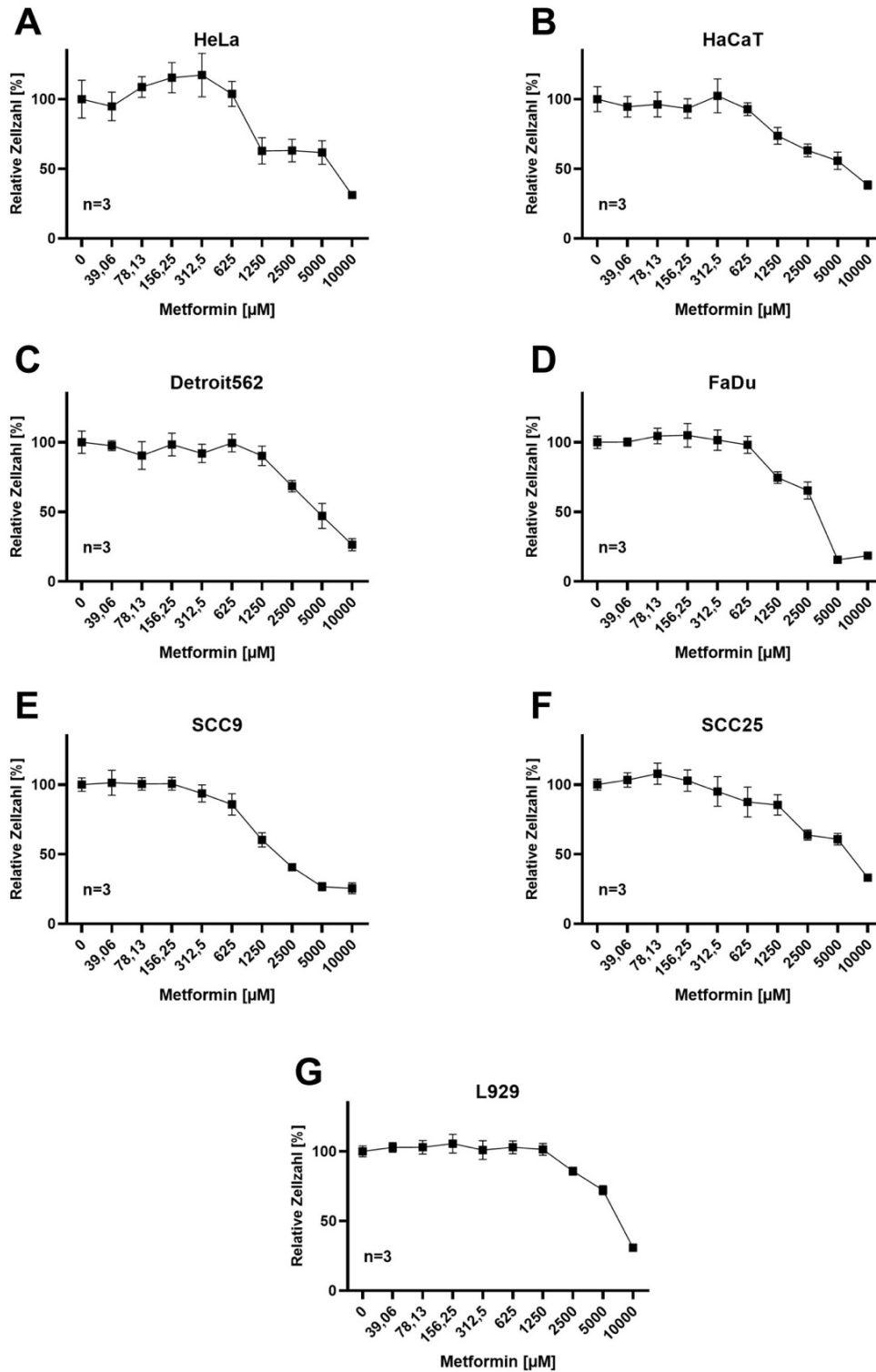
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, lassen sich altersbedingte oder -assoziierte Erkrankungen durch die Kalorien-Restriktion effektiv vermeiden bzw. treten erst zu einem späteren Zeitpunkt auf.

CRM, wie Metformin, welches bereits klassisch bei der Behandlung von Diabetes Typ 2 eingesetzt wird, zeigten bereits in klinischen Studien ein krebsminderndes Risiko (Dong et al., 2012, Erices et al., 2013, Iliopoulos et al., 2011). Es wirkt u.a. über die AMPK, deren Aktivierung mTOR hemmt, wodurch wiederum das Zellwachstum und die Proliferation reduziert werden (Del Barco et al., 2011, Morales and Morris, 2015).

Neben Metformin stellt NAD<sup>+</sup> ein weiteres potenzielles CRM dar. Wie bereits beschrieben, gehen hohe NAD<sup>+</sup> Konzentrationen mit einer erhöhten Sirtuin-Aktivität einher (Zhang and Sauve, 2018), was sich rückkoppelnd wieder über die LKB1 auf die AMPK und somit auf mTOR auswirkt (Cantó et al., 2009, Wang et al., 2019). Aus diesem Grund sollte hier das antiproliferative Potenzial dieser CRM auf ausgesuchte Zelllinien analysiert werden.

#### **3.2.1 Proliferationsverhalten ausgewählter Zelllinien unter Metformin**

In der folgenden Versuchsreihe wurde unter Verwendung des ZytoTox die Auswirkung einer Metformingabe auf das proliferative Verhalten verschiedener Zelllinien untersucht. Da der Schwerpunkt der Arbeitsgruppe auf HNSCC-Linien liegt, sollten diese zusätzlich zu den Vergleichslinien analysiert werden. So wurden die HNSCC-Zelllinien Detroit562, FaDu, SCC9, SCC25 sowie die Vergleichslinien HeLa, HaCaT und L929 untersucht. Die Zellen wurden mit einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe beginnend mit 10 mM Metformin für 72 h inkubiert. Als Negativkontrolle diente Vollmedium ohne Metformin. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.



**Abb. 12: A-G Proliferationsverhalten der Zelllinien HeLa, HaCaT, Detroit562, FaDu, SCC9, SCC25 und L929 unter Metformin**

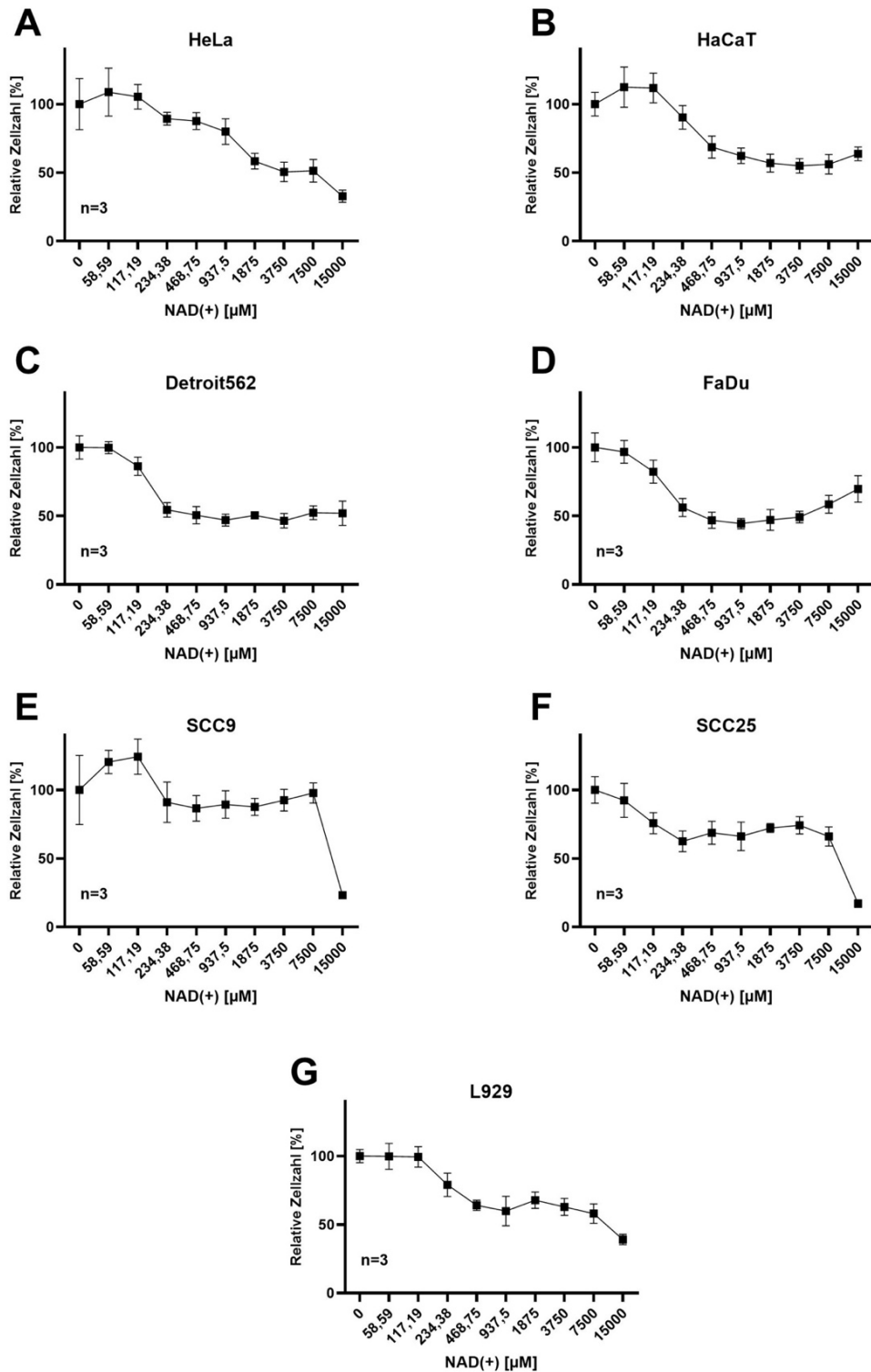
Die Proliferation der genannten Zelllinien wurde über einen Zeitraum von drei Tagen analysiert. Die Zellen wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe ausgehend von 10 mM Metformin stimuliert. Als Kontrolle diente reines Vollmedium. Die Auswertung erfolgte mittels ZytoTox (Kapitel 2.2.3). Die Ergebnisse wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und die gemittelten Ergebnisse in der obigen Abbildung zusammengefasst.

Alle Zelllinien zeigten eine Senkung der Zellzahl. Jedoch reagierten sie unterschiedlich sensitiv auf Metformin. Bei einer Konzentration von 10 mM lag bei den HaCaT-Zellen die relative Zellzahl noch bei  $38,2\% \pm 3$  im Vergleich zur Kontrolle, während bei FaDu unter gleichen Bedingungen der Wert nur bei  $18,5\% \pm 2,3$  lag (Abb. 12 B + D). Auffällig war auch ein gewisser Schwellenwert zwischen 625 und 1250  $\mu\text{M}$  bei dem bei fast allen Zelllinien der Beginn der Inhibition der Proliferation zu erkennen war. Die Zellen der Linie L929 schienen das Metformin am ehesten zu tolerieren, da selbst bei einer Konzentration von 5000  $\mu\text{M}$  der Wert noch bei  $72,1\% \pm 3,3$  lag (Abb. 12 G). Zusammenfassend zeigte sich, dass Metformin die Zellzahlen verschiedener Zelllinien von murin bis human und von Tumor- zu nicht-Tumor-Zelllinie signifikant senkte.

### 3.2.2 Proliferationsverhalten ausgewählter Zelllinien unter NAD<sup>+</sup>

Die Analyse des Proliferationsverhaltens der Zelllinien HeLa, HaCaT, Detroit562, FaDu, SCC9, SCC25 und L929 unter NAD<sup>+</sup> wurde ähnlich wie bei Metformin durchgeführt. Die Startkonzentration war 15 mM NAD<sup>+</sup> ebenfalls in einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe bei gleichen Kontrollen. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt.

Auch bei NAD<sup>+</sup> konnte man bei allen Zelllinien eine klare Inhibition der Proliferation erkennen. Jedoch fielen deutliche Unterschiede in der Sensitivität auf. Während bei SCC9 und SCC25 erst bei dem Übergang von 7500  $\mu\text{M}$  zu 15000  $\mu\text{M}$  ein deutlicher Abfall der relativen Zellzahl zu erkennen war (7500  $\mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup>: SCC9:  $97,8\% \pm 7,4$ , SCC25:  $66,1\% \pm 7,1$ ; 15000  $\mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup>: SCC9:  $23,2\% \pm 1,2$ , SCC25:  $17,1\% \pm 2,9$ ) (Abb. 13 E + F), zeigten FaDu und Detroit562 schon bei 234,38  $\mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup> einen signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten (117,19  $\mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup>: Detroit562:  $86,2\% \pm 6,7$ , FaDu:  $82,3\% \pm 8,4$ ; 234,38  $\mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup>: Detroit562:  $54,5\% \pm 5,2$ , FaDu:  $56,2\% \pm 6,5$ ) (Abb. 13 C + D). Bei L929 gab es einen zweistufigen Kurvenverlauf. Sowohl der Übergang von 15000  $\mu\text{M}$  auf 7500  $\mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup>, als auch der Übergang von 117,19  $\mu\text{M}$  zu 234,38  $\mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup> schienen hier relevante Konzentrationen zu sein (L929: 117,19  $\mu\text{M}$ :  $99,5\% \pm 9,5$ , 234,38  $\mu\text{M}$ :  $79\% \pm 8,5$ , 7500  $\mu\text{M}$ :  $58,0\% \pm 7,2$ , 15000  $\mu\text{M}$ :  $39,1\% \pm 3,8$ ) (Abb. 13 G).



**Abb. 13: A-G Proliferationsverhalten der Zelllinien HeLa, HaCaT, Detroit562, FaDu, SCC9, SCC25 und L929 unter NAD<sup>+</sup>**

Die Proliferation der genannten Zelllinien wurde über einen Zeitraum von drei Tagen analysiert. Die Zellen wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe ausgehend von 15 mM NAD<sup>+</sup> Medium stimuliert. Als Kontrolle diente reines Vollmedium. Die Auswertung erfolgte mittels ZytoTox (Kap. 2.2.3). Die Ergebnisse wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und die gemittelten Ergebnisse in der obigen Abbildung zusammengefasst.

### **3.3 Analyse der Genexpression von FGF-21, IGF-1, Map1lc3B und p53 mittels real-time RT-PCR**

Durch die Schlüsselrolle der Aminosäuren in diversen Stoffwechselwegen, z.B. Zitratzyklus, Lipidstoffwechsel, Harnstoffzyklus, Glukoneogenese und vielen mehr, kann die Zelle durch Aminosäure-Restriktion und mTOR vermittelt in den LEM wechseln. Da sich bereits die Restriktion einer einzelnen Aminosäure – z.B. Met – als ausreichend erwies und diese sich in früheren Studien zur Aminosäure-Restriktion in der eigenen Arbeitsgruppe bereits als Standard etabliert hat, wurde diese auch in den nachfolgenden Versuchsansätzen verwendet. Da es zu dieser Versuchsreihe im Bereich PCR so weit keine Vorversuche durch die Arbeitsgruppe gab, wurde in nachfolgendem Versuch die murine Zelllinie L929 gewählt. Diese wird in der Regel für Vorversuche verwendet, da hier oft die eindeutigsten Reaktionen zu erkennen sind. Im Folgenden sollte der Einfluss der MetR auf die Regulation ausgesuchter Faktoren (FGF-21, IGF-1, Map1lc3b und p53) mittels real-time RT-PCR analysiert werden.

Wie in der Einleitung beschrieben, stellen FGF-21 und IGF-1 Gegenspieler dar, deren Konzentrationen u.a. Einfluss auf das Proliferationsverhalten einer Zelle nehmen kann (Kap. 1.2.1). Das Gen Map1lc3b (LC3B) spielt eine Schlüsselrolle in der Autophagie und dient als Marker für Autophagosomen (Klionsky et al., 2016). p53 ist ein Tumorsupressor, welcher einer der wichtigsten Kontrollinstanzen bei der Entstehung maligner Läsionen darstellt, aber auch sehr häufig im Kontext Proliferation von Bedeutung ist und entsprechend reguliert sein kann (Vousden and Ryan, 2009).

Für den Versuch wurden 100.000 Zellen/Well der Zelllinie L929 in einer 6-Well-Platte zum einen mit Vollmedium, zum anderen mit Met-freiem Medium (Met-) inkubiert. Die Zellen wurden an Tag eins, drei und fünf geerntet und anschließend Zellpellets gebildet, aus denen die Isolierung der RNA und die Synthese der cDNA erfolgte (Kap. 2.2.4.1, 2.2.4.2) Die Analyse der Expression für die Gene FGF-21, IGF-1, Map1lc3B und p53 erfolgte mittels RT-PCR. Diese wurden auf die Standardgene Act- $\beta$ , Gapdh und Hprt1 normiert und im Anschluss der relative Expressionsunterschied zwischen Met+ (1-fach)

und Met- (x-fach zu Met+) mittels der  $\Delta\Delta$ -Ct-Methode bestimmt. Hierbei wurde eine >2-fache Expression grün, keine Regulation (1-2-fach) blau und eine Runterregulierung (<1) grau dargestellt.

Es zeigte sich bereits nach einem Tag MetR ein deutlicher Anstieg des Faktors FGF-21 (>2). Genau andersherum verhielt es sich bei IGF-1, der - wie in Tab. 12 ersichtlich - meistens bereits nach 24 h MetR herunterreguliert wurde (<1). Map1lc3B zeigte in der Analyse der Regulation ein etwas unsteteres Bild. So ist zwar deutlich zu erkennen, dass nach drei Tagen MetR eine Hochregulation um >2 stattfand, an Tag eins und fünf jedoch blieb es größtenteils unverändert und nur in einzelnen Versuchen zeigten sich Regulationen, die den Wert 2 überstiegen (Tab. 12: Map1lc3B d1 + 5). Anders verhielt es sich bei p53. Hier fiel auf, dass nach fünf Tagen eine deutliche Hochregulation des Faktors stattfand, der durchgängig in allen drei Versuchen und bei allen drei Standards zu beobachten war (Tab. 12: p53, d5). An Tag eins und drei zeigte sich zwar vermehrt eine mindestens zweifach höhere Konzentration des Tumorsuppressors, jedoch schien hier der Zeitfaktor der MetR eine Rolle zu spielen.



		Fgf21					
		Met-	Met+	Met-	Met+	Met-	Met+
V1	AktB	3,3 (2,1-5,1)	1,0 (0,8-1,2)	2,7 (2,0-3,8)	1,0 (0,8-1,3)	8,7 (5,5-13,7)	1,0 (0,7-1,5)
V2		33,8 (29,6-38,6)	1,0 (0,9-1,2)	9,4 (7,4-11,8)	1,0 (0,7-1,4)	15,1 (12,8-17,9)	1,0 (0,9-1,2)
V3		3,2 (2,2-4,7)	1,0 (0,8-1,2)	1,4 (1,1-1,9)	1,0 (0,8-1,2)	5,5 (5,4-5,7)	1,0 (0,7-1,4)
V1	Gapdh	2,8 (2,0-3,9)	1,0 (0,9-1,1)	2,6 (2,2-3,1)	1,0 (0,9-1,1)	15,6 (10,5-23,3)	1,0 (0,8-1,3)
V2		31,2 (29,7-32,7)	1,0 (0,9-1,1)	6,4 (5,2-8,0)	1,0 (0,9-1,2)	13,3 (10,5-16,9)	1,0 (0,7-1,5)
V3		2,1 (1,5-3,1)	1,0 (0,9-1,2)	0,9 (0,7-1,1)	1,0 (0,8-1,2)	4,5 (3,6-5,7)	1,0 (0,8-1,3)
V1	Hprt	3,8 (2,7-5,3)	1,0 (0,9-1,1)	2,8 (2,3-3,4)	1,0 (0,9-1,1)	11,2 (7,2-17,5)	1,0 (0,7-1,4)
V2		10,0 (8,6-11,7)	1,0 (0,9-1,2)	19,7 (18,2-21,4)	1,0 (0,7-1,4)	46,7 (37,4-58,5)	1,0 (0,9-1,2)
V3		1,5 (1,1-2,1)	1,0 (0,9-1,2)	1,3 (1,1-1,7)	1,0 (0,8-1,2)	31,4 (29,2-33,7)	1,0 (0,7-1,4)
		d1		d3		d5	
		Igf1					
		Met-	Met+	Met-	Met+	Met-	Met+
V1	AktB	0,5 (0,4-0,8)	1,0 (0,8-1,3)	0,3 (0,3-0,5)	1,0 (0,8-1,3)	0,6 (0,5-0,9)	1,0 (0,7-1,4)
V2		0,8 (0,7-1,0)	1,0 (0,9-1,1)	0,3 (0,2-0,4)	1,0 (0,7-1,4)	0,1 (0,1-0,2)	1,0 (0,9-1,1)
V3		1,2 (1,0-1,5)	1,0 (0,9-1,2)	0,5 (0,4-0,6)	1,0 (0,9-1,1)	0,1 (0,1-0,1)	1,0 (0,1-0,1)
V1	Gapdh	0,4 (0,3-0,6)	1,0 (0,8-1,2)	0,3 (0,3-0,4)	1,0 (0,9-1,1)	1,1 (0,9-1,4)	1,0 (0,9-1,1)
V2		0,7 (0,6-0,9)	1,0 (0,9-1,1)	0,2 (0,2-0,3)	1,0 (0,9-1,2)	0,1 (0,1-0,2)	1,0 (0,7-1,5)
V3		0,8 (0,7-0,9)	1,0 (0,9-1,1)	0,3 (0,3-0,3)	1,0 (0,9-1,1)	0,1 (0,1-0,1)	1,0 (0,8-1,2)
V1	Hprt	0,6 (0,5-0,8)	1,0 (0,8-1,2)	0,4 (0,3-0,4)	1,0 (0,9-1,1)	0,8 (0,6-1,1)	1,0 (0,8-1,2)
V2		0,2 (0,2-0,3)	1,0 (0,9-1,2)	0,6 (0,5-0,8)	1,0 (0,7-1,4)	0,5 (0,4-0,6)	1,0 (0,9-1,1)
V3		0,6 (0,5-0,6)	1,0 (0,9-1,2)	0,4 (0,4-0,5)	1,0 (0,9-1,1)	0,5 (0,4-0,6)	1,0 (0,8-1,3)
		d1		d3		d5	
		Map1lc3b					
		Met-	Met+	Met-	Met+	Met-	Met+
V1	AktB	1,6 (1,2-2,3)	1,0 (0,8-1,3)	2,3 (1,7-3,0)	1,0 (0,7-1,4)	1,3 (1,0-1,6)	1,0 (0,8-1,3)
V2		2,1 (1,7-2,6)	1,0 (0,8-1,3)	2,1 (1,7-2,7)	1,0 (0,7-1,5)	1,7 (1,6-1,9)	1,0 (0,9-1,1)
V3		2,9 (2,4-3,6)	1,0 (0,9-1,1)	4,8 (3,9-5,8)	1,0 (0,9-1,1)	2,0 (1,9-2,1)	1,0 (0,8-1,3)
V1	Gapdh	1,4 (1,1-1,7)	1,0 (0,8-1,3)	2,2 (2,1-2,4)	1,0 (0,8-1,3)	2,3 (2,0-2,5)	1,0 (0,9-1,1)
V2		1,9 (1,6-2,3)	1,0 (0,8-1,3)	1,5 (1,2-1,8)	1,0 (0,8-1,3)	1,5 (1,3-1,8)	1,0 (0,7-1,5)
V3		2,0 (1,7-2,2)	1,0 (0,9-1,1)	2,9 (2,8-3,1)	1,0 (0,9-1,1)	1,6 (1,3-2,1)	1,0 (0,9-1,2)
V1	Hprt	1,9 (1,6-2,3)	1,0 (0,8-1,3)	2,4 (2,1-2,7)	1,0 (0,8-1,3)	1,6 (1,3-2,0)	1,0 (0,8-1,2)
V2		0,6 (0,6-0,8)	1,0 (0,8-1,3)	4,5 (4,1-5,9)	1,0 (0,7-1,5)	5,3 (4,5-6,3)	1,0 (0,9-1,1)
V3		1,4 (1,3-1,5)	1,0 (0,9-1,1)	4,5 (4,4-4,6)	1,0 (0,9-1,1)	11,3 (10,3-12,5)	1,0 (0,8-1,3)
		d1		d3		d5	
		p53					
		Met-	Met+	Met-	Met+	Met-	Met+
V1	AktB	2,3 (1,7-3,1)	1,0 (0,7-1,4)	2,0 (1,5-2,8)	1,0 (0,6-1,6)	39,0 (26,6-51,4)	1,0 (0,9-1,1)
V2		1,7 (1,3-2,2)	1,0 (0,9-1,1)	5,3 (3,9-7,0)	1,0 (0,7-1,4)	3,4 (2,7-4,2)	1,0 (0,8-1,3)
V3		31,4 (24,5-40,2)	1,0 (0,9-1,1)	1,4 (1,0-2,1)	1,0 (0,8-1,3)	9,9 (7,2-13,6)	1,0 (0,8-1,3)
V1	Gapdh	1,3 (1,0-1,8)	1,0 (0,8-1,3)	2,2 (1,7-2,9)	1,0 (0,6-1,6)	2,6 (2,0-3,4)	1,0 (0,9-1,2)
V2		1,1 (0,9-1,4)	1,0 (1,0-1,1)	3,8 (2,9-5,0)	1,0 (0,7-1,4)	5,6 (4,6-6,9)	1,0 (0,8-1,3)
V3		20,9 (17,3-25,3)	1,0 (0,9-1,1)	0,9 (0,6-1,3)	1,0 (0,8-1,3)	8,0 (5,4-11,9)	1,0 (0,9-1,2)
V1	Hprt	3,1 (2,3-4,2)	1,0 (0,8-1,3)	2,3 (1,6-3,4)	1,0 (0,7-1,5)	442,8 (331,3-591,8)	1,0 (0,9-1,2)
V2		0,6 (0,5-0,7)	1,0 (1,0-1,1)	11,5 (8,5-15,5)	1,0 (0,7-1,4)	10,2 (8,4-12,3)	1,0 (0,8-1,3)
V3		14,7 (12,4-17,4)	1,0 (0,9-1,1)	1,3 (1,0-1,9)	1,0 (0,8-1,3)	55,7 (40,2-77,2)	1,0 (0,8-1,2)
		d1		d3		d5	

Legende	
Referenz	
< 1,0	
1,0-2,0	
> 2,0	

Tab. 12: PCR-Ergebnisse der Analyse der Faktoren FGF-21, IGF-1, MAP1lc3B und p53

100.000 Zellen L929 wurden mit Vollmedium oder Met- inkubiert und aus den Zellen an Tag eins, drei und fünf je Zellpellets gebildet. Nach Isolierung der RNA mit anschließender cDNA-Synthese erfolgte die RT-PCR für die Gene FGF-21 (Fgf21), IGF-1 (Igf1), MAP1lc3B und p53. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta$ -Ct-Methode (Kapitel 2.2.4.3). Zur genaueren Analyse wurden drei Standardgene verwendet (Akt- $\beta$  (AktB), Gapdh und Hprt). In der Tabelle sind zur besseren Übersicht die Ergebnisse als x-fach Werte (Regulation unter Met-) in Form einer Heat-Map dargestellt. Die Kontrolle wurde auf 1 normiert (weiß dargestellt). Werte größer 2 (grün dargestellt) bedeuten stärker in Met- exprimiert, kleiner 1 (grau dargestellt) entsprechen in Met- runterreguliert. Blaue Felder mit Werten zwischen 1 und 2 wurden als nicht reguliert definiert. Gezeigt sind die drei Einzelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten (V1, V2 und V3) und die jeweiligen bestimmten Werte zu den drei verwendeten Standards. Alle in Klammern stehenden Werte stellen die STABW als Fehlerbereich (Range) umgerechnet dar (Livak and Schmittgen, 2001).

### **3.4 Massenspektrometrische Untersuchung der Zelllinie HeLa unter MetR**

Wie bereits beschrieben, induziert die Kalorienrestriktion sowie die Protein-, bzw. Aminosäurerestriktion einen LEM, der mit Hilfe eines molekularen Netzwerkes und dem Masterplayer mTOR auf Proteinebene umgesetzt wird. Gleichzeitig ist davon auszugehen, dass es aufgrund des reduzierten Energie- bzw. Aminosäureniveaus zu wesentlichen Änderungen im allgemeinen Metabolismus kommt. Die Auswirkungen der MetR wurden bereits in einer anderen Promotionsarbeit dieser Arbeitsgruppe in der murinen Zelllinie L929 genau analysiert (Koderer, 2021). Mit Hilfe der LC/MS wurden die Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen alle 24 h unter Vollmedium und unter MetR auf 156 wasserlösliche Metaboliten sowohl intra- als auch extrazellulär untersucht. Analysiert wurden unterschiedliche Stoffwechselwege, vom Kohlenhydratstoffwechsel über den Zitratzyklus bis hin zum Harnstoffzyklus und dem Yang-Zyklus. Außerdem wurden auch Moleküle wie ADP, ATP, GDP, GTP, NADH und viele weitere analysiert.

Die Analysen ermöglichten die Erstellung eines präzisen metabolen Finger- bzw. Fußabdruckes, der einzelne Metaboliten zu bestimmten Zeitpunkten als Marker für MetR bzw. LEM qualifiziert (Schmitz et al., 2021). In dieser Arbeit sollte die Analyse des Metaboloms mit der humanen Zelllinie HeLa durchgeführt werden, um erste Erkenntnisse über die Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede im Metabolismus unter MetR zwischen murinen und humanen Zellen zu gewinnen. Entsprechend werden die Ergebnisse der eigenen Arbeit den Ergebnissen für L929 gegenübergestellt und miteinander verglichen.

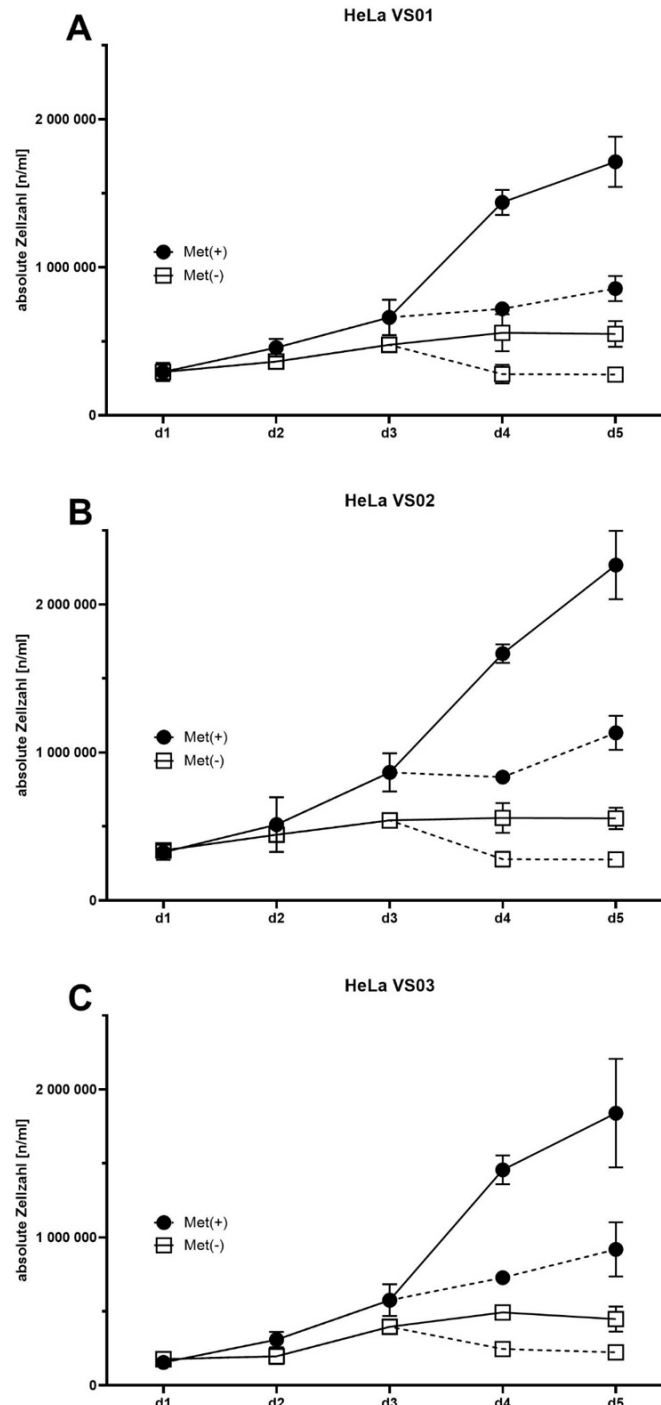
Der Metabolismus von HeLa wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Die Zellen wurden entweder mit Vollmedium oder in Met- inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst bei jeder Schale 1 ml Medium abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets mit jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet. Es wurden sowohl die Zellextrakte (intrazelluläre Metaboliten), als auch die dazugehörigen

Medienüberstände (extrazelluläre Metaboliten) gemessen. Die Analyse erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. Werner Schmitz, welcher die Messungen und Auswertung der Primärdaten durchführte. Zur besseren Übersicht werden in dem nachfolgenden Kapitel nur ausgewählte Ergebnisse als Heat-Map aufgezeigt. Eine vollständige Übersicht über die Gesamtergebnisse befindet sich im Appendix.

#### **3.4.1 Analyse des Proliferationsverhalten der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels automatisierter Zellzählung**

Für die Bildung der Pellets von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Probe wurden die - von der Petrischale mittels Trypsins gelösten - Zellen automatisiert im EVE-Counter gezählt. Die Ergebnisse wurden zur Qualitätskontrolle und der Analyse des Proliferationsverhaltens unter Vollmedium bzw. unter MetR für jeden der drei durchgeführten Versuche graphisch aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.

Unter Vollmedium zeigten die Zellen eine starke Proliferation mit einer ungefähren Verdopplungsrate pro Tag. Der weniger starke Anstieg der Zellen zwischen Tag 4 und 5 könnte auf das zunehmende Dichtwachsen der Zellen und dem langsam zunehmenden Verbrauch des Mediums zurückzuführen sein. Gut erkennbar ist in allen drei Versuchen die zunehmende Stagnation der Proliferation der Zellen unter MetR, die ab Tag drei fast vollkommen zum Erliegen kommt. Da die Zellzahl ungefähr konstant blieb und nicht sank, ist davon auszugehen, dass es sich um einen Proliferationsstopp handelte und nicht etwa um ein Absterben der Zellen.



**Abb. 14: Darstellung des Proliferationsverhaltens der Zelllinie HeLa unter Vollmedium und MetR der für die Massenspektrometrie durchgeführten Versuche**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellzählung in absoluten Zellzahlen (n) der drei getrennt durchgeführten Versuche (VS01-VS03) für die Massenspektrometrie nach Zählung mittels EVE-Counter an den jeweils fünf aufeinanderfolgenden Versuchstagen, wobei jeder Wert den Mittelwert aus den drei Petrischalen mit denselben Bedingungen darstellt. Zur möglichst genauen Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Messung pro Petrischale drei bis vier Mal und anschließend gemittelt. Die Ergebnisse für das Vollmedium (Met+) sind mit einem schwarzen Kreis, die Ergebnisse für Met- mit einem weißen Viereck dargestellt. Da an den Tagen 4 und 5 nur die Hälfte der Zellen ausgesät wurde, wurden zur Darstellung des „tatsächlichen“ Proliferationsverhaltens die gemessenen Werte verdoppelt. Die tatsächlich bestimmten Werte für Tag 4 und 5 sind ebenfalls in dem Graphen dargestellt und durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

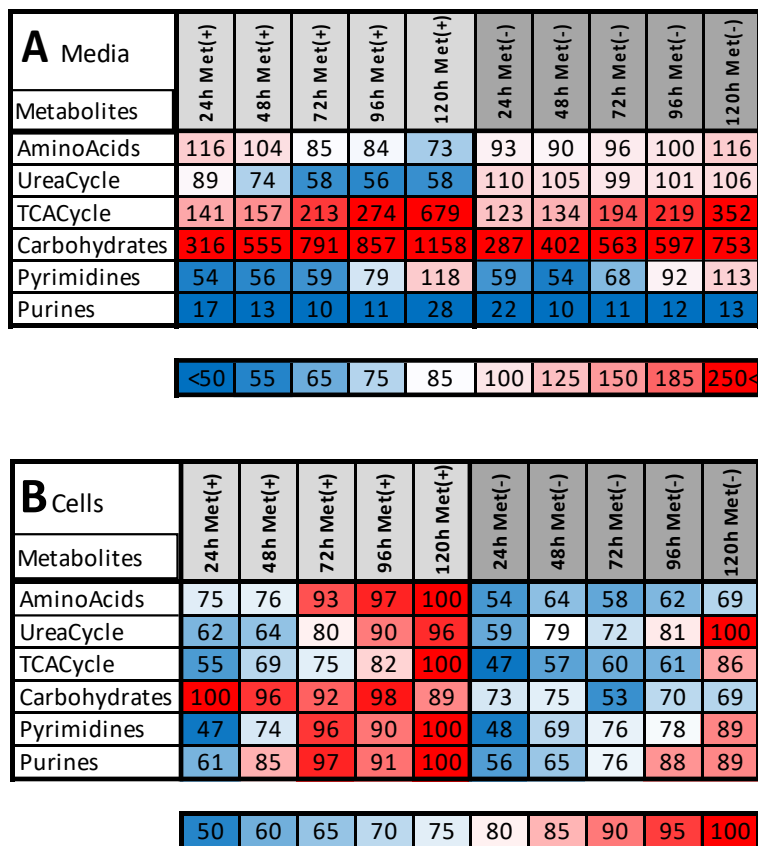
### 3.4.2 Massenspektrometrische Untersuchung der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen

Neben der Analyse einzelner Metaboliten können auch die unterschiedlichen Stoffwechselwege betrachtet werden. Dafür wurden die Massen einzelner Moleküle summiert und nach der Zusammenfassung in einer thematischen Gruppe verglichen. Ein gutes Beispiel ist der Zitratzyklus. Häufig führt z.B. ein Defizit an Glukose dazu, dass Zwischenprodukte wie Oxalacetat oder alpha-Ketoglutarat für die Glukoneogenese genutzt werden. Ein entsprechendes Absaugen der Metaboliten kann dann einfach in einer entsprechenden Abnahme der Gesamtmasse eines Stoffwechselweges erkannt werden.

Eine erste Analyse der summierten relativen Massen aus verschiedenen Stoffwechselwegen ist in Abb. 15 dargestellt. Aufgeführt sind die Aminosäuren (Amino Acids), der Harnstoffzyklus (Urea Cycle), der Zitratzyklus (TCA Cycle), die Kohlenhydrate, die Pyrimidine sowie die Purine aus dem Überstand (Abb. 15 A) und den Zellextrakten (Abb. 15 B). Bei den Werten der Medien wurde die Messung des verwendeten Ausgangs-Mediums als 100% definiert, das heißt bei Sezernierung von Metaboliten aus der Zelle ins Medium kann es auch zu Werten >100% kommen. Für die Zellextrakte wurde der höchste gemessene Wert in jeder Testreihe innerhalb eines Experiments als 100% definiert. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus den drei Experimenten in den einzelnen Tabellen zusammengefasst (Kap. 2.2.6).

Unter MetR kam es zu einem geringeren Anstieg der intrazellulären Metaboliten als in der Kontrollgruppe. Betrachtet man beispielsweise die intrazellulären Aminosäurekonzentrationen unter MetR von Tag eins bis fünf, stiegen diese von 54% auf gerade einmal 69% an, während in der Kontrollgruppe mit Vollmedium ein Anstieg von 75% auf 100% stattfand. Eine wesentlich geringere intrazelluläre relative Konzentration unter MetR konnte auch bei den Kohlenhydraten beobachtet werden (Abb. 15 B: Met-: d1: 73%, d5: 69%; Met+: d1: 100%, d5: 89%). Auffällig ist, dass sich in den Medienüberständen ein genau entgegengesetztes Bild darstellte. Wie in Abb. 15 A zu sehen ist, stieg der extrazelluläre Gehalt an Aminosäuren und Metaboliten des Harnstoffzyklus unter MetR bis Tag fünf konstant an bzw. blieb konstant auf einem

hohen Level von bis zu >100%, während bei der Kontrollgruppe eine Verminderung der relativen Konzentration im Verlauf von fünf Tagen zu beobachten war.



**Abb. 15 A und B – Übersicht einzelner Stoffwechselgruppen der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen**

Das Metabolom der Zelllinie HeLa wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden  $5 \times 10^5$  beziehungsweise  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen (Kap. 2.2.6) in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Met-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Met-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst bei jeder Schale 1 ml Medium abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets mit jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet. Die Zellextrakte, sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Der besseren Übersicht wegen sind hier die gesamten Metaboliten eines Stoffwechselweges **A** gemessen in den Überständen (extrazellulär) sowie **B** in den Zellextrakten (intrazellulär) dargestellt. Dabei wurde die Messung des verwendeten Ausgangs-Mediums als 100% definiert, während für die Zellextrakte der höchste gemessene Wert in jeder Testreihe innerhalb eines Experiments als 100% definiert wurde. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus den drei Experimenten in den Tabellen zusammengefasst und in obiger Heat-Map dargestellt.

Im Folgenden werden ausgesuchte Ergebnisse dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden verschiedene thematische Gruppen erstellt, die im Wesentlichen Metaboliten beschreiben, die im Met-Stoffwechsel bzw. in einem LEM relevant sind. Die Gruppen lauten:

- (A) Aminosäuren (proteinogen)
- (B) Aminosäuren (nicht proteinogen) und Aminosäurederivate
- (C) „Direkt Met/Cystein abhängige Metaboliten“
- (D) „Indirekt Met/Cystein abhängige Metaboliten“
- (E) Energiewährung
- (F) Metaboliten der Glykolyse

### **(A) Aminosäuren (proteinogen)**

Betrachtet man die proteinogenen Aminosäuren einzeln (Abb. 16), so ergibt sich ein wesentlich detaillierteres Bild. Wobei es gilt, zwischen intra- und extrazellulär zu unterscheiden.

**Extrazellulär (Abb. 16 A):** Zwar unterscheiden sich die relativen Mengen im Medium, allerdings ist der Trend in beiden Vergleichsgruppen bei vielen Aminosäuren identisch. Beispiele sind das Arginin und das Glutamat, deren Konzentrationen im Medium unter beiden Bedingungen kontinuierlich zunehmen sowie Cystein und Serin, deren Konzentrationen extrazellulär kontinuierlich abnehmen. Vollkommen unterschiedlich sieht der Verlauf bei den Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Tyrosin aus. Hier nimmt der Gehalt im Medium in der Kontrolle kontinuierlich ab, während unter MetR bei einer wesentlich geringeren Gesamtzellzahl die Konzentration im Überstand sogar noch steigt.

**Intrazellulär (Abb. 16 B):** Ein ähnliches, wenn auch deutlicheres Bild ergibt sich für den intrazellulären Verlauf der Aminosäurekonzentrationen. Auch hier zeigen einzelne Aminosäuren einen mehr oder minder identischen Trend in beiden Gruppen. Beispiele sind das Arginin und das Serin, welche unter beiden Bedingungen intrazellulär kontinuierlich steigen. Doch lässt sich hier viel deutlicher die Tendenz erkennen, dass die Zellen im Vollmedium den Aminosäurepool volltanken. Im Gegensatz dazu zeigen viele Aminosäuren unter MetR nur eine leichte Zu- oder Abnahme. Die Zellen nehmen also bei weitem nicht so massiv Aminosäuren auf, wie die Zellen im Vollmedium.

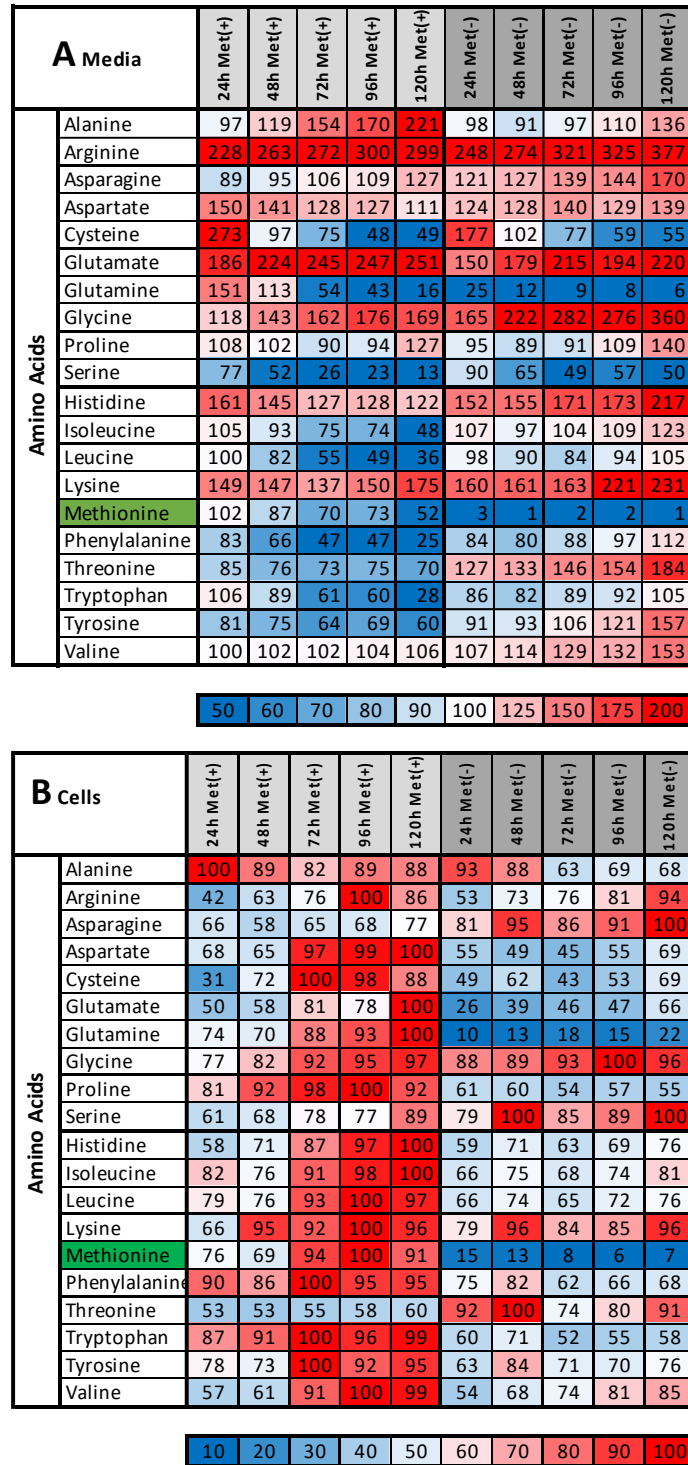


Abb. 16 A und B: Heat-Map Darstellung der proteinogenen Aminosäuren.

Der Metabolismus der humanen Tumorzelllinie HeLa wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Die Zellen wurden entweder mit Met-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde je 1 ml Medium abgenommen und Zellpellets mit  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. In dieser Abbildung sind die gemittelten Ergebnisse der proteinogenen Aminosäuren gemessen in A den Medienüberständen (extrazellulär) sowie B den Zellextrakten (intrazellulär) dargestellt. Bei A definiert das Ausgangsmedium die 100%, während bei B der höchste gemessene Wert in der Testreihe 100% definiert. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus drei Experimenten in den jeweiligen Tabellen zusammengefasst.



Dementsprechend sind auch die Aminosäuren von besonderem Interesse, deren Gehalt unter Met- auffällig hoch bleibt und bei Met+ nur leicht bis kaum ansteigt, die also eine Reserve bilden, nämlich Threonin und Asparagin. Auch Arginin, Glycin, Serin, Lysin – Aminosäuren deren Konzentration unter beiden Konditionen hochgehalten wird – gelten aus dem gleichen Grund gesondertes Interesse. Eine besondere Rolle spielt noch die Aminosäure Glutamin. Diese zeigt einen besonders starken Abfall unter Met-Bedingungen.

### (B) Aminosäuren – nicht proteinogen – und Aminosäurederivate

Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Urea Cycle	Citrulline	39	30	52	63	57	45	69	82	79	100
	ArgSucc	63	68	89	77	100	36	52	63	86	98
	Ornithine	68	34	44	57	50	54	63	57	86	100
	N-Acetylornithine	60	73	78	94	100	67	80	54	60	75

25	30	35	40	50	60	70	80	90	100
----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

**Abb. 17: Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – nicht proteinogene Aminosäuren und Aminosäurederivate des Harnstoffzyklus**

Der Metabolismus der humanen Tumorzelllinie HeLa wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Die Zellen wurden entweder mit Met-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde je 1 ml Medium abgenommen und Zellpellets mit  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Der besseren Übersicht wegen sind in dieser Abbildung die gemittelten Ergebnisse der nicht proteinogenen Aminosäuren und der Aminosäurederivate des Harnstoffzyklus dargestellt. Der höchste gemessene Wert in der Testreihe wurde als 100% definiert. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus drei Experimenten in der Tabelle zusammengefasst.

Bei den nicht-proteinogenen Aminosäuren des Harnstoffzyklus zeigte sich unter Met- bei Citrullin und Ornithin der deutlichste Unterschied in beiden Gruppen. So war unter MetR eine kontinuierlich steigende Konzentration bis hin zum Maximalwert zu erkennen, wohingegen die Werte der Kontrollgruppe bei beiden Metaboliten nur bis ca. 50% anstiegen. Argininosuccinat stieg in beiden Gruppen kontinuierlich bis zu ca. 100% an. In der Kontrolle erhob sich die Konzentration von N-Acetyl-Ornithin bis zum Maximalwert. Auffällig war hier, dass sich bei MetR die Konzentrationen nur leicht änderten und nicht kontinuierlich anstiegen.

## (C) „Direkte Met/Cystein abhängige Metaboliten“

Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acid Derivatives	GSH	78	100	66	64	36	47	38	27	36	40
	GSSG	69	93	92	100	52	27	30	57	56	63
	Homocysteine	42	50	88	79	100	40	67	57	54	61
	Homoserine	53	53	55	58	60	92	100	74	80	91
	Cystathionine	47	75	78	92	100	22	31	20	23	24
	SAM	6	64	73	54	66	39	72	72	53	100
	Creatine	48	60	87	92	100	46	58	78	83	86
	Creatinine	60	48	88	100	90	47	51	59	64	66
	Carnitine	24	50	72	97	100	29	51	77	91	98
	N-Ac-Putrescine	52	27	14	18	10	73	100	66	95	79
	Spermidine	62	53	53	76	92	68	65	53	76	100

5	10	15	30	50	60	70	80	90	100
---	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

**Abb. 18: Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – direkte Met/Cystein abhängige Metaboliten**

Der Metabolismus der humanen Tumorzelllinie HeLa wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Die Zellen wurden entweder mit Met-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde je 1 ml Medium abgenommen und Zellpellets mit  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Der besseren Übersicht wegen sind in dieser Abbildung die gemittelten Ergebnisse der direkt-Met/Cystein abhängigen Metaboliten dargestellt. Der höchste gemessene Wert in der Testreihe wurde als 100% definiert. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus drei Experimenten in der Tabelle zusammengefasst.

Wie bereits erwähnt, spielt Met in diversen Stoffwechselwegen und bei der Synthese diverser Metabolite eine tragende Rolle. So sind humane Körperzellen in der Lage, durch die Umsetzung von Homocystein, S-Adenosylhomocystein oder SAM aus Met essenzielle Aminosäuren wie beispielsweise Cystein zu synthetisieren bzw. zu regenerieren. Umgekehrt kann Met auch wieder direkt aus Homocystein regeneriert werden oder durch den sog. Yang-Zyklus, auch Methionin-Salvage-Stoffwechselweg genannt, synthetisiert werden. Ausgangsprodukt ist hier das 5'-Methylthioadenosin (MTA), welches durch sechs chemische Reaktionen in Met umgewandelt werden kann. Ausgangsprodukt für MTA stellt SAM oder dessen decarboxylierte Form Decarboxy-SAM dar, welches durch die Übertragung einer Aminopropylgruppe zu MTA synthetisiert wird (Finkelstein and Martin, 2000, Pommerrenig et al., 2011). Ausgesuchte Metabolite, deren Synthese also direkt abhängig von Met bzw. Cystein ist, sind in Abb. 18 dargestellt. Cystathion wird aus Homocystein und Serin synthetisiert und stellt eine Vorstufe der semi-essentiellen Aminosäure Cystein dar. Einer der deutlichsten Unterschiede zeigten Homocystein und Cystathion, welche unter Met+ einen starken Anstieg der relativen

intrazellulären Konzentrationen aufwiesen, während diese unter Met- insgesamt wesentlich geringer ausfielen und weitestgehend konstant blieben. So war Cystathion nach fünf Tagen unter MetR um ca. 75% geringer intrazellulär vertreten und auch Homocystein wies mit ca. 40% geringerer Konzentration deutliche Unterschiede auf, wohingegen in der Kontrollgruppe beide Metaboliten bis hin zum Maximalwert stiegen. Kreatinin reagierte ähnlich, wenn auch weniger deutlich. Homoserin, ein Aminosäurederivat der Aminosäure Serin, verhielt sich genau gegenteilig. Es zeigte im Vollmedium eine leicht steigende relative Konzentration (53% auf 60%), während die relative Konzentration unter MetR konstant ca. doppelt so hoch blieb. SAM hingegen ergab ein recht unstetes Bild, welches aus schwankenden relativen Konzentrationen sowohl bei MetR als auch unter Normalbedingungen bestand. Die Metaboliten Kreatin und Karnitin wiesen fast keine Unterschiede verglichen mit der Kontrollgruppe auf. Spermidin stellt wie bereits erwähnt, ein Zwischenprodukt bei der Bildung von Spermin aus Putrescin und decarboxyliertem SAM dar. Die intrazelluläre Konzentration von Spermidin unterschied sich unter MetR nicht maßgeblich gegenüber dem Vollmedium. Anders verhielt es sich bei der Vorstufe N-Acetyl-Putrescin. Hier gab es einen deutlichen Konzentrationsanstieg unter MetR im Vergleich zum Abfall in der Kontrollgruppe. Vergleicht man die Werte beider Bedingungen, ließen sich bei Met- bis zu 10-fach höhere Konzentrationen nachweisen. Dies ist einer der deutlichsten Unterschiede beider Gruppen in der gesamten massenspektrometrischen Analyse und bedarf daher besonderer Aufmerksamkeit.

Das Antioxidationsmittel Glutathion (GSH) und das Oxidationsmittel Glutathion-Disulfid (GSSG) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des oxidativen Stresses. GSH, ein Tripeptid aus Glutamat, Cystein und Glycin, zeigte ab Tag eins konstant niedrigere Konzentrationen - um bis zu 60% - unter MetR. Auch GSSG wies im Vergleich insgesamt niedrigere Werte unter MetR auf, auch wenn es bis Tag 5 leicht anstieg.

**(D) „Indirekt Met/Cystein abhängige Metaboliten“**

Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
	Glucosamine	44	100	96	84	92	31	41	17	20	17
	Glycerol-3-P	87	59	29	17	21	100	80	50	52	66
	Acetoacetate	52	61	88	96	100	54	55	63	64	67
	UDP-Glc	63	100	80	64	63	50	90	59	64	78

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

**Abb. 19: Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – „indirekt Met/Cystein abhängige Metaboliten“**

Der Metabolismus der humanen Tumorzelllinie HeLa wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Die Zellen wurden entweder mit Met-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde je 1 ml Medium abgenommen und Zellpellets mit  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. In dieser Abbildung sind die gemittelten Ergebnisse der indirekt-Met/Cystein-abhängigen Metaboliten dargestellt. Der höchste gemessene Wert in der Testreihe wurde als 100% definiert. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus drei Experimenten in der Tabelle zusammengefasst.

Auch bei Metaboliten, die nicht direkt von Met bzw. Cystein abhängig sind, kam es im Zuge der MetR zu Veränderungen der relativen Konzentrationen. Einige ausgewählte Beispiele sind in Abb. 19 aufgeführt. Glucosamin, ein im menschlichen Körper vorkommender Aminosucker und ein Derivat der D-Glukose, nahm unter MetR massiv ab und zeigte nach fünf Tagen eine um mehr als fünffach reduzierte relative Konzentration auf. Glycerol-3-Phosphat spielt eine Rolle im Lipidstoffwechsel der Lipogenese. Hier war in beiden Gruppen ein kontinuierlicher Abfall der intrazellulären Konzentration zu erkennen, wobei dieser unter MetR dreifach geringer ausfiel und damit die relative Konzentration unter MetR deutlich über dem Wert der Kontrolle lag. Das Acetoacetat-Level stieg zwar in beiden Gruppen über fünf Tage lang an, allerdings unter MetR etwas langsamer und geringer als unter Normalbedingungen. UDP-Glukose hingegen zeigte ein etwas unstetes Bild und ließ sich somit nicht eindeutig kategorisieren.

**(E) Energiewährung**

Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Co-Factors	ADP	60	100	34	23	23	46	80	50	36	49
	ATP	47	91	15	3	3	32	100	33	15	38
	cAMP	63	100	68	74	71	51	36	10	13	7
	GDP	71	100	34	21	25	56	89	50	38	51
	GTP	95	100	2	0	1	36	88	32	3	8
	mNAM	87	100	85	87	80	68	48	26	31	31
	NAD+	74	84	100	97	89	62	68	63	79	75
	NADH	56	100	63	34	44	19	57	54	58	63

0	15	30	50	65	70	75	80	90	100
---	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

**Abb. 20: Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – Energiewährung**

Der Metabolismus der humanen Tumorzelllinie HeLa wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Die Zellen wurden entweder mit Met-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde je 1 ml Medium abgenommen und Zellpellets mit  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. In dieser Abbildung sind die gemittelten Ergebnisse der sog. Energiewährung dargestellt. Der höchste gemessene Wert in der Testreihe wurde als 100% definiert. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus drei Experimenten in der Tabelle zusammengefasst.

MetR scheint die Tumorzelle dazu zu veranlassen, Co-Faktoren wie ADP, ATP, GDP und GTP weniger stark zu verbrauchen. Dies lässt die erhöhte intrazelluläre Konzentration genannter Metabolite unter MetR im Vergleich zum sehr niedrigen Gehalt in der Kontrollgruppe vermuten, wie es sich in Abb. 20 zeigt.

Anders verhielt es sich beim cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP), dessen intrazellulärer Gehalt unter MetR kontinuierlich abnahm. Dieser Unterschied von Faktor 10 ist enorm und stellt diesen Co-Faktor in eine zentrale Rolle im veränderten Stoffwechsel unter MetR. cAMP fungiert im menschlichen Körper als sog. Second-Messenger verschiedener Enzyme. Besonders bei cAMP abhängigen Proteinkinasen (PKAs) hat er großen Einfluss auf diverse Signalkaskaden und den damit verbundenen Auswirkungen im Körper (Zhang et al., 2020a). N1-Methylnicotinamid (mNAM) ist über verschiedene Mechanismen vermutlich in der Lage, die AMPK zu aktivieren (Nejabati et al., 2020a, Nejabati et al., 2020b), welche, wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle im mTOR Regulationsmechanismus spielt. Es zeigte sich ein vergleichbares Bild wie bei cAMP, wenn auch weniger extrem. Nichtsdestotrotz ist der bei mNAM 2,5-fach niedrigere intrazelluläre Spiegel nach MetR als klarer Unterschied zu bezeichnen.

Während NADH intrazellulär in der Kontrollgruppe insgesamt leicht sank, stieg die relative Konzentration unter MetR um 44 Prozentpunkte an. NAD<sup>+</sup> stieg in beiden Gruppen leicht an (13-15%).

**(F) Metaboliten der Glykolyse**

Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Glycolysis	Hexose-P	99	100	52	48	41	84	74	68	96	78
	Fructose-1,6-P2	24	96	57	46	42	40	100	76	87	84
	Dihydroxyacetone-P	75	100	35	27	31	61	75	56	52	52
	Glycerol/-on-P	75	100	33	27	30	62	77	56	51	52
	3-Phosphoglycerate	51	61	42	35	34	59	92	92	82	100
	Phosphoenolpyruvate	92	74	54	39	37	63	98	95	91	100
	Lactate	100	94	85	90	80	70	70	49	66	62
	Pyruvate	51	71	80	100	87	61	65	45	55	67

15	25	30	40	60	70	80	85	90	100
----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

**Abb. 21: Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – Metaboliten der Glykolyse**  
 Der Metabolismus der humanen Tumorzelllinie HeLa wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Die Zellen wurden entweder mit Met-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde je 1 ml Medium abgenommen und Zellpellets mit 1 x 10<sup>6</sup> Zellen gebildet und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. In dieser Abbildung sind die gemittelten Ergebnisse der Metaboliten der Glykolyse dargestellt. Der höchste gemessene Wert in der Testreihe wurde als 100% definiert. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus drei Experimenten in der Tabelle zusammengefasst.

Die Metaboliten der Glykolyse spielen vor allem im Hinblick auf die vorangegangenen Experimente mit der Glukose-Restriktion eine wichtige Rolle. So war es von großem Interesse, wie sich dieser Stoffwechselzweig unter Aminosäure-Restriktion verhält. Gleichzeitig wurde einer der wichtigsten Stoffwechselwege der Glukose in Zusammenhang mit der MetR gebracht. Nach fünf Tagen ließen sich deutliche Unterschiede in den Konzentrationen feststellen. So waren die Metaboliten Fructose-1,6-bisphosphonat (Fructose-1,6-P2), 3-Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat intrazellulär unter MetR um bis zu 50% erhöht, während unter Normalbedingungen ubiquitär eine Gehaltssenkung zu verzeichnen war. Anders verhielt es sich bei Lactat und Pyruvat, wo die Konzentrationen unter MetR nahezu konstant niedrig blieben, während sie bei der Kontrollgruppe dauerhaft anstiegen. Die übrigen Metaboliten blieben unter MetR weitestgehend konstant und wiesen unter Met+ einen deutlichen Konzentrationsabfall auf.

### **3.4.3 Analyse des metabolischen Fingerabdrucks der Zelllinie HeLa nach 72 h unter proliferativen Bedingungen**

Wie im vorherigen Kapitel bereits beschrieben, lassen sich Veränderungen im Stoffwechsel einer humanen Tumorzelle nachweisen, wenn diese über einen längeren Zeitraum einer MetR ausgesetzt ist. Dies ermöglichte ein Erstellen eines metabolischen Fingerabdrucks. Diese im Folgenden als „Fingerprint“ beschriebene Momentaufnahme des Stoffwechsels der Zelllinie HeLa ist in Abb. 22 dargestellt.

Betrachtet man die proteinogenen Aminosäuren, so zeigten sich hier bis auf einige Ausnahmen nach 72-stündiger MetR um bis zu 50% geringere intrazelluläre Konzentrationen. Ganz ähnlich verhielt es sich bei Argininosuccinat und N-Acetylmethionin. Bei Met/Cystein abhängigen Metaboliten kristallisierten sich ebenfalls bereits nach 72 h deutliche Unterschiede heraus. So zeigten GSH, GSSG, Homocystein, Cystathion und Kreatinin unter 72-stündiger MetR einen intrazellulären Konzentrationsabfall im Vergleich zur Kontrollgruppe, während sich Homoserin und N-Ac-Putrescin genau gegenteilig verhielten. N-Ac-Putrescin stieg sogar im Extrem fast fünffach an.

Auch Glucosamin und Glycerol-3-Phosphat verhielten sich gegenüber der Kontrollgruppe bereits nach 72 h auffallend anders, genau entgegengesetzt. Während der Gehalt von Glucosamin um mehr als das fünffache sank, stieg Glycerol-3-Phosphat um fast das Doppelte an.

Bei den Molekülen der Energiewährung ließ sich der metabolische Fingerabdruck nach 72 h vor allem bei cAMP und mNAM deutlich durch stark verminderte Konzentrationen unter MetR erkennen.

Cells		72h Met(+)	72h Met(-)	Cells		72h Met(+)	72h Met(-)	
Amino Acids	Alanine	82	63	Amino Acid Derivatives	GSH	66	27	
	Arginine	76	76		GSSG	92	57	
	Asparagine	65	86		Homocysteine	88	57	
	Aspartate	97	45		Homoserine	55	74	
	Cysteine	100	43		Cystathionine	78	20	
	Glutamate	81	46		SAM	73	72	
	Glutamine	88	18		Creatine	87	78	
	Glycine	92	93		Creatinine	88	59	
	Proline	98	54		Carnitine	72	77	
	Serine	78	85		N-Ac-Putrescine	14	66	
	Histidine	87	63		Spermidine	53	53	
	Isoleucine	91	68		Co-Factors	Glucosamine	96	17
	Leucine	93	65			Glycerol-3-P	29	50
	Lysine	92	84			Acetoacetate	88	63
	Methionine	94	8			UDP-Glc	80	59
	Phenylalanine	100	62		ADP	34	50	
	Threonine	55	74		ATP	15	33	
	Tryptophan	100	52		cAMP	68	10	
Tyrosine	100	71	GDP	34	50			
Valine	91	74	GTP	2	32			
Urea Cycle	Citrulline	52	82	mNAM	85	26		
	ArgSucc	89	63	NAD+	100	63		
	Ornithine	44	57	NADH	63	54		
	N-Acetylornithine	78	54					

**Abb. 22: Metaboler Fingrabdruk der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen nach 72 h**

Der Metabolismus der humanen Tumorzelllinie HeLa wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Die Zellen wurden entweder mit Met-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde je 1 ml Medium abgenommen und Zellpellets mit  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Der höchste gemessene Wert in der Testreihe wurde als 100% definiert. Dargestellt ist in dieser Abbildung das metabolische Profil des MetR induzierten LEM nach 72 h. Zur besseren Übersicht wurden die Metaboliten in die oben bereits erwähnten Gruppen eingeteilt.

### 3.4.4 Vergleich der massenspektrometrischen Analyse der murinen

#### Fibroblastenzelllinie L929 mit der humanen Tumorzelllinie HeLa unter proliferativen Bedingungen

Vergleicht man nun die im Zuge der Dissertation von Corinna Koderer erstellten Analysen der murinen Fibroblastenzelllinie L929 (Abb. 23 A) mit den für diese Dissertation erstellten Heat-Maps der humanen Zelllinie HeLa (Abb. 23 B), lassen sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch erhebliche Unterschiede feststellen.

Betrachtet man die Übersicht der verschiedenen Stoffwechselwege mit den summierten relativen Massen, fällt auf, dass es bei L929 Zellen unter MetR generell zu einer Verringerung der relativen Konzentration der intrazellulären Metaboliten und somit zur Sekretion z.B. der Aminosäuren ins Medium (hier nicht dargestellt) kommt (Abb. 23 A)



und dies nach fünf Tagen bereits deutlich ausgeprägt ist. Bei den HeLa-Zellen lässt sich dieses Phänomen bei den Aminosäuren ebenfalls beobachten, wenn auch weniger ausgeprägt. Generell zeigen aber auch die anderen Stoffwechselgruppen intrazellulär die Tendenz, unter MetR mit fortschreitender Zeit im Vergleich weniger stark anzusteigen.

A Cells										
	24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Metabolites										
AminoAcids	82	99	90	99	100	83	72	64	72	65
UreaCycle	78	100	90	98	87	87	79	66	78	75
TCACycle	66	98	88	100	77	68	82	62	74	62
Carbohydrates	76	100	75	92	73	79	86	73	75	65
Pyrimidines	100	81	68	89	68	98	81	60	67	46
Purines	95	82	88	96	100	95	83	84	80	61

45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

B Cells										
	24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Metabolites										
AminoAcids	75	76	93	97	100	54	64	58	62	69
UreaCycle	62	64	80	90	96	59	79	72	81	100
TCACycle	55	69	75	82	100	47	57	60	61	86
Carbohydrates	100	96	92	98	89	73	75	53	70	69
Pyrimidines	47	74	96	90	100	48	69	76	78	89
Purines	61	85	97	91	100	56	65	76	88	89

50	60	65	70	75	80	85	90	95	100
----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

**Abb. 23: A und B. A) Metabolismus der Zelllinie L929 unter MetR und proliferativen Bedingungen-Darstellung von C. Koderer B) Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – Eigene Darstellung.**

Die Versuchsreihe der Zelllinie L929 wurde von C. Koderer durchgeführt und dient hier als Vergleichswert (murine L929 gegen humane HeLa). Der Metabolismus der L929-Zellen wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über fünf Tage analysiert. Es wurden  $5 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen L929 ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Met- oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Met+ und Met- in Triplets. Alle 24 h wurden Zellpellets mit jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet. Die Zellextrakte, sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mittels LC/MS analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Dargestellt ist in dieser Abbildung eine Übersicht über die Gesamtheit der Metaboliten in den einzelnen Stoffwechselwegen, wobei **A** die Auswertung der durch C. Koderer analysierten Daten darstellt und **B** die eigene Arbeit als Vergleich zeigt. Für die eigene Abbildung wurde das Metabolom der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Inkubation und Analyse erfolgten analog der der L929-Zellen. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Hier sind in **B** die Zellextrakte (intrazelluläre Metabolite) dargestellt. Dabei wurde bei A und B der höchste gemessene Wert in jeder Testreihe innerhalb eines Experiments als 100% definiert. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus den drei Experimenten in den Tabellen zusammengefasst und in obiger Heat-Map dargestellt.

Da massenspektrometrische Analysen teuer sind und einen großen Zeitaufwand mit sich bringen, wird zukünftig nicht jedes Labor die Kapazitäten aufweisen können, oben beschriebene Versuchsreihen durchführen zu können, um z.B. die Wirksamkeit unterschiedlicher CRM in HeLa zu analysieren. Aus diesem Grund wurde ebenfalls im Zuge der Dissertation „*In Vitro* Analyse der Methionin-Restriktion im murinen Modellsystem L929 sowie im Plattenepithelkarzinom – HNSCC“ neben dem großen „Fingerprint“ ein kleiner wie im vorherigen Kapitel bereits erwähnt „Footprint“ erstellt. Dadurch kann durch eine Art „Fast-Tracking“ mit Hilfe ausgewählter Metaboliten und alternativen Messmethoden (wie z.B. ELISA) die mögliche Induktion eines LEM auf schnellere Art und Weise analysiert werden. Der „Footprint“ zur Definition eines LEM in der murinen Zelllinie L929 wurde in der Dissertation von Corinna Koderer (Koderer, 2021) aus einer Kombination aus Acetoacetat, Kreatin, Spermidin, GSSG und dem Verhältnis von ADP/ATP definiert (Abb. 24 A).

Beim Vergleich mit dem „Footprint“ und den gleichen Metaboliten aus den Ergebnissen der eigenen Arbeit (Abb. 24) zeigt sich allerdings, dass diese Metaboliten nicht einfach auf die humane Tumorzelllinie HeLa übertragbar sind. Spermidin beispielsweise zeigte keine relevanten Unterschiede unter MetR. Acetoacetat verhielt sich bei der Zelllinie HeLa fast völlig gegenteilig zur Zelllinie L929 unter MetR. Sollte es also möglich sein, die HeLa-Zellen in einen LEM zu versetzen, so würde sich dieser durch die Kombination anderer Metaboliten ausdrücken.

A L929	24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
	Acetoacetate	65	77	66	65	61	61	81	85	100
Creatine	52	68	68	100	96	66	66	52	53	40
Spermidine	95	94	90	100	98	92	78	66	57	39
GSSG	16	27	33	62	100	20	17	18	17	11
ADP	100	41	29	22	10	49	0	1	4	3
ATP	100	89	61	49	23	47	13	7	6	7

B HeLa	24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
	Acetoacetate	52	61	88	96	100	54	55	63	64
Creatine	48	60	87	92	100	46	58	78	83	86
Spermidine	62	53	53	76	92	68	65	53	76	100
GSSG	69	93	92	100	52	27	30	57	56	63
ADP	60	100	34	23	23	46	80	50	36	49
ATP	47	91	15	3	3	32	100	33	15	38

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

**Abb. 24 A und B: A „Footprint“ der Zelllinie L929 unter MetR und proliferativen Bedingungen-(Schmitz et al., 2021) B Vergleich der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – Eigene Zahlenwerte.**

Die Versuchsreihe der Zelllinie L929 wurde von C. Koderer durchgeführt und dient hier lediglich als Vergleichswert zweier Zelllinien (murine L929 und humane HeLa). Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über fünf Tage analysiert. Es wurden  $5 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen L929 ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Met- oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Met+ und Met- in Triplets. Alle 24 h wurden Zellpellets mit jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet. Die Zellextrakte, sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mittels LC/MS analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Dargestellt ist in dieser Abbildung der „Footprint“ der Zelllinie L929 verglichen mit den gleichen Metaboliten unter identischen Bedingungen der Zelllinie HeLa, wobei **A** die Auswertung der durch C. Koderer analysierten Daten darstellt und **B** die eigene Arbeit zeigt. Für **B** wurde der Metabolismus der humanen Tumorzelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Die Zellen wurden analog denen der L929-Zellen inkubiert und ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Der höchste gemessene Wert in der Testreihe wurde als 100% definiert. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus drei Experimenten in der Tabelle zusammengefasst.

Aus diesem Grund wurde ein eigener „Footprint“ aus fünf anderen Metaboliten erstellt, welche charakteristische Stoffwechselveränderungen von HeLa-Zellen zeigten. Dieser setzt sich aus der Kombination der Metaboliten N-Acetyl-Putrescin, Glucosamin, Glycerol-3-Phosphat, cAMP und mNAM zusammen (Abb. 25). All diese Metaboliten zeigten auch nach kürzerer Zeit (72 h) unter MetR deutliche Unterschiede in ihrer relativen Konzentration, indem diese stark zunahm oder absank. Noch deutlichere Unterschiede wiesen die benannten Metaboliten nach fünf Tagen auf. Auch die Sekretion der Aminosäuren unter MetR war ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 15 A).

Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Footprint	N-Ac-Putrescine	52	27	14	18	10	73	100	66	95	79
	Glucosamine	44	100	96	84	92	31	41	17	20	17
	Glycerol-3-P	87	59	29	17	21	100	80	50	52	66
	cAMP	63	100	68	74	71	51	36	10	13	7
	mNAM	87	100	85	87	80	68	48	26	31	31

15	25	30	40	60	70	80	85	90	100
----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

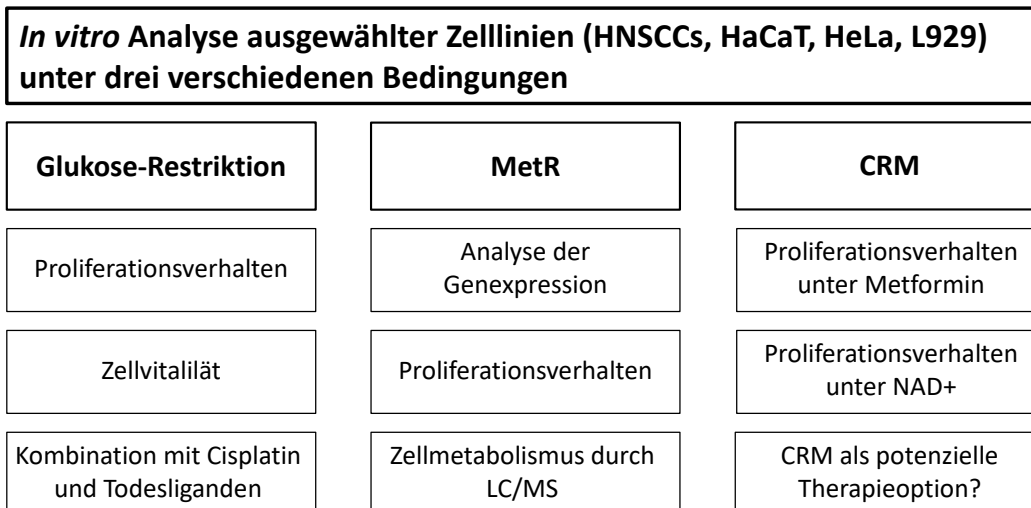
**Abb. 25: „Footprint“ der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen**

Der Metabolismus der humanen Tumorzelllinie HeLa wurde unter MetR und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Die Zellen wurden entweder mit Met-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde je 1 ml Medium abgenommen und Zellpellets mit  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Der höchste gemessene Wert in der Testreihe wurde als 100% definiert. Dargestellt ist in dieser Abbildung der „Footprint“ der Zelllinie HeLa.

## 4 Diskussion

Masse und Energie spielen bei der Beeinflussung von Wachstum und Proliferation neoplastischer Zellen eine grundlegende Rolle. So kann ein Energiemangel beispielsweise lebensverlängernde und gesundheitsfördernde Wirkung aufweisen und hat das Potenzial, die Zelle in einen LEM zu versetzen (Kap. 1.4). Ansatzpunkte zur Umsetzung eines Biomasse- bzw. Energiemangels stellen vor allen Dingen der wichtige Energieträger „Glukose“ und ein wesentlicher Bestandteil der Biomasse – die Aminosäuren – dar. In dieser Arbeit sollte der Einfluss unterschiedlicher Restriktionsformen bzw. Supplementierungen auf HNSCC-Zelllinien (FaDu, Detroit 562, SCC9 und SCC25), die humane Krebszelllinie HeLa und die immortalisierte Linie HaCaT sowie die murine Fibroblastenzelllinie L929 untersucht werden (Abb. 26). Hierfür wurden je nach Versuch die genannten Zelllinien unter Glukose-Restriktion bzw. MetR gesetzt und/oder mit den CRM Metformin oder NAD<sup>+</sup> inkubiert. Hierdurch sollte in *in vitro* Analysen der Frage nachgegangen werden, ob sich die jeweiligen Ansätze grundsätzlich als Therapieformen gegen Krebs, im Besonderen gegen HNSCC, eignen und ob bzw. in welcher Form ein LEM induziert werden kann.

Die Zelllinie L929 hat sich in vorherigen Arbeiten als Modellsystem etabliert und wurde daher vorrangig in den Versuchen verwendet. Ein Schwerpunkt lag auf dem Vergleich von murinen mit humanen Systemen, weswegen die humane HeLa-Linie oft im direkten Vergleich mit der murinen L929-Linie verwendet wurde. Ihr Proliferationsverhalten wurde unter Glukose-Restriktion analysiert und dieses später auch bei den HNSCC-Linien und HaCaT unter konstant niedrigem Glukose-Level in Kombination mit Cisplatin und Todesliganden untersucht. Auch die Auswirkungen der CRM Metformin und NAD<sup>+</sup> wurden auf die gleiche Weise analysiert. Zuletzt wurde mittels RT-PCR eine Analyse der Genexpression von L929 unter MetR durchgeführt. Der Hauptversuch lag jedoch auf der LC/MS der Zelllinie HeLa unter MetR, wodurch eine genaue Analyse des Metaboloms sowie ein direkter Vergleich zum murinen Modellsystem L929 stattfand. Mithilfe dieser Ergebnisse konnte ein metaboler „Footprint“ erstellt werden, der spezifisch für HeLa unter MetR codiert.



**Abb. 26: Arbeitsprogramm – vereinfachte schematische Übersicht**

Zusammenfassend sind im Folgenden die Ergebnisse dargelegt:

1. Die vollständige Glukose-Restriktion wirkt auf die untersuchten Zelllinien letal. Wobei eine konstant niedrige Glukosekonzentration, bei der die Zellen überleben, diese teils sensitiver auf Cisplatin und Todesliganden reagieren lässt.
2. Die Gabe von CRM wie Metformin und NAD+ zeigt eine antiproliferative Wirkung auf die untersuchten Zelllinien.
3. Eine MetR hat Einfluss auf die Expression ausgesuchter Gene von L929-Zellen und reguliert diese je nach Restriktionsdauer signifikant hoch bzw. runter.
4. HeLa-Zellen zeigen unter MetR ein antiproliferatives Verhalten und zeigen deutliche Veränderungen im Metabolismus auf. Dies zeigt sich an der Definition eines HeLa-spezifischen „Footprints“, welcher zukünftig für die vereinfachte Analyse von CRM verwendet werden kann. Zusätzlich konnten durch Vergleiche zum metabolen Fingerabdruck von L929-Zellen sowohl deutliche Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten zwischen dem Metabolismus einer humanen Krebszelle und der einer murinen Fibroblastenzelle unter MetR definiert werden. So ähnelt sich unter MetR beispielsweise die Tendenz beider Zellarten, Aminosäuren zu sekretieren, wohingegen sich einzelne Metaboliten, wie die des „Footprints“, teilweise komplett unterscheiden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert, wobei sich die Ausführlichkeit nach den für diese Arbeit relevantesten Schwerpunkten richtet.

---

#### **4.1 Antiproliferative und sensitivierende Wirkung der Glukose-Restriktion auf die Zelllinien L929 und HeLa**

Eine Glukose-Restriktion zeigte eine starke antiproliferative Wirkung und eine Glukosekonzentration von unter 1 mM wurde nach mehr als 72 h weder von HeLa noch von L929 toleriert und führte über die Zeit zum Zelltod. In zum ZytoTox ergänzenden mikroskopischen Untersuchungen an beiden Zelllinien konnte bestätigt werden, dass eine zu geringe Glukosekonzentration sich letal auf die Zellen auswirkt. Je geringer die Glukosespiegel und umso fortgeschrittener die Zeit, desto weniger Zellen schienen lebendig zu sein. Die HeLa-Zellen reagierten hierbei weitaus sensitiver auf eine Glukose-Restriktion als die L929-Zellen, was dadurch zu erklären sein könnte, dass es sich um Krebszellen handelt, welche eventuell eine größere Glukoseabhängigkeit aufweisen als „gesunde“ proliferative Zellen - wie L929. Da aber wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben sowohl Turmozellen als auch proliferierende Zellen den Warburg-Metabolismus nutzen, decken sich die Ergebnisse mit der Literatur, da beide Zelllinien glukoseabgängig sind und eine absolute Restriktion nicht tolerieren (Sandulache et al., 2011, Vander Heiden et al., 2009).

Da einige Krebszellen im Verlauf Resistenzen gegen apoptotische Liganden wie TNF $\alpha$  oder FasL sowie Chemoresistenzen gegen Krebsmedikamente wie Cis-Diamindichlorplatin (II), besser bekannt als Cisplatin, entwickeln können (Galluzzi et al., 2012, Reed, 1999), sollte der Einfluss einer Glukose-Restriktion auf die Wirksamkeit der genannten Faktoren untersucht werden. Unter Glukosekonzentrationen, bei denen in der mikroskopischen Untersuchung die Zellproliferation ohne erhöhten Zelltod abnahm, reagierten L929-Zellen sensitiver auf FasL und TNF $\alpha$ . Unter denselben Verhältnissen zeigten HeLa-Zellen weder in der Kontrollgruppe noch unter Glukose-Restriktion ein Absinken der Zellzahl. Die Krebszelllinie HeLa hat die Sensitivität für Apoptose induzierende Faktoren also offensichtlich verloren und auch eine konstante Glukose-Restriktion von 7 mM konnte diese nicht wiederherstellen.

Nichtsdestotrotz reagierten vor allem die HeLa Zellen sehr sensitiv auf eine fortlaufende Glukose-Restriktion (Kap. 3.1.1, 3.1.2), weswegen sich die Frage stellt, inwiefern sich diese als Therapieansatz gegen Krebs umsetzen lässt.

Hauptbestandteil der von uns aufgenommenen Nahrungskohlenhydrate sind Stärke und Disaccharide wie Saccharose und Laktose. Diese werden nach Resorption im Intestinaltrakt vor allem in das Monosaccharid Glukose gespalten (Löffler and Müller, 2014). Die Vermutung liegt also nahe, dass durch eine Restriktion von Nahrungskohlenhydraten, also einer „Low-Carb-Diät“, ähnlich positive Ergebnisse erzielt werden könnten und diese als Therapieansatz bzw. additive Therapie zu den bestehenden klinischen Therapieschemata genutzt werden könnte.

Hierzu veröffentlichten Roberts und Kollegen 2017 in ihrem Artikel „A Ketogenic Diet Extends Longevity and Healthspan in Adult Mice“ eine Reihe interessanter Ergebnisse. So konnten sie anhand von isokalorisch gefütterten C57BL/6-Mäusen nachweisen, dass eine extreme Form der Kohlenhydratreduktion, die ketogene Diät (89% fetthaltige Diät) zu einer 13,6% höheren mittleren Lebenserwartung führte im Vergleich zur Kontrollgruppe (65% kohlenhydrathaltige Diät). Die dritte Gruppe der „Low-Carb“-Mäuse (70% fetthaltige Diät) hingegen wies keine signifikanten Unterschiede in der mittleren Lebenserwartung im Vergleich zu den anderen Gruppen auf. Zusätzlich wiesen Mäuse, die unter ketogene Diät gestellt wurden, verbesserte physiologische Funktionen auf und die Inzidenz von Tumoren (insbesondere des histiozytären Sarkoms) zum Todeszeitpunkt bei durchgängiger ketogener Ernährung sank (Roberts et al., 2017). Aber kann die ketogene Diät auch bei einer bereits vorhandenen Krebserkrankung therapeutisch wirksam sein?

Eine ketogene Diät in Kombination mit Radio-/Chemotherapie insbesondere bei HNSCC ist grundsätzlich möglich und wurde in einer klinischen Phase-1-Studie auch bereits durchgeführt, führte aufgrund diverser Nebenwirkungen jedoch zu einem Studienabbruch von 6 der 9 Probanden (Anderson et al., 2016). Hinzu kommt, dass die Hepatozyten in der Leber den Blutglukosespiegel mit 4-7 mM konstant halten (Staiger et al., 2014) und ihn somit im Falle einer kritischen Unterschreitung durch Glukoneogenese wieder normalisieren können. Die Leber ist dadurch in der Lage bei zu niedrigen Blutzuckerspiegeln, beispielsweise infolge eines überdurchschnittlichen Glukoseverbrauches, die Glukoseproduktion anzukurbeln und bis zu 120-200 g Glukose zu bilden (König et al., 2012). Das reicht dem Tumor theoretisch, um eine ständige



Glukoseversorgung zu gewährleisten. Dies legt den Schluss nahe, dass eine reine Low-Carb bzw. ketogene Diät das Tumorstadium vielleicht verlangsamen und im Falle der ketogenen Diät sicherlich auch zu einer verlängerten mittleren Lebensspanne beitragen kann, der Hauptfokus bei der Beeinflussung des Warburg-Metabolismus durch eine Kohlenhydrat-Restriktion aber weiterhin in der reinen Glukose-Restriktion der Tumorzelle liegen sollte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Überleben der in dieser Arbeit unter Glukose-Restriktion gesetzten Zellen stark abhängig von Faktoren wie der Inkubationszeit und der Zellzahl war, was darauf hindeutet, dass die Zelle dann stirbt, wenn die Glukose einen Schwellenwert unterschreitet, der zum Überleben notwendig ist. Hinzu kommt, dass die *in vitro* Verhältnisse des ZytoTox berücksichtigt werden müssen, welche nicht einfach auf einen lebenden Organismus übertragen werden können. So wird die Glukoneogenese hier z.B. außer Acht gelassen, da die verwendeten Zelllinien diese nicht durchführen können. Zukünftig könnten weitere Versuchsreihen daher zusätzlich Hepatozyten enthalten, welche die Leber symbolisieren könnten oder Versuche durchgeführt werden, bei denen durch eine Perfusionskultur ständig niedrige Glukose-Konzentration konstant gehalten werden. *In vivo* wird die Glukose-Restriktion vermutlich am leichtesten durch antiglykolytische Medikamente und Inhibitoren induziert, wodurch das Essverhalten, wie bei einer rein ketogenen Diät, nicht vollständig umgestellt werden müsste.

## **4.2 Induktion eines LEM durch MetR**

Eine MetR bzw. Aminosäure-Restriktion führt zur Inhibition der Proliferation und zur Induktion eines LEM (Schmitz et al., 2021). Damit bietet die MetR einen vielversprechenden Ansatz in der Krebstherapie (Kap 1.4.2) und bedarf weiterer Forschung, um ein besseres Verständnis über Zellmetabolismus, Genexpression und Anwendungsmöglichkeiten zu gewinnen. Hierfür wurden im Folgenden die Genexpression unter MetR (RT-PCR), das Proliferationsverhalten (ZytoTox) und der Metabolismus (LC/MS) ausgewählter Zellen genauer untersucht.

#### 4.2.1 Regulation der Genexpression unter MetR bei L929-Zellen

Unter MetR kam es zu einer veränderten Genregulation aller untersuchten Faktoren (FGF-21, IGF-1, Map1lc3B und p53). Es kam sowohl zu gesteigerten als auch zu verminderten Genexpressionen. Alle analysierten Gene standen weitestgehend in Zusammenhang mit dem mTOR-Regulationsmechanismus. So standen FGF-21 und IGF-1 für Wachstum und Proliferation, Map1lc3B für die Autophagie und p53 für die Tumorsuppression bzw. die Interaktion über FOXO mit SIRT1 (Abb. 1). FGF-21 wurde unter MetR von Tag eins an hochreguliert. IGF-1 verhielt sich, wie zu erwarten, entgegengesetzt und es fand eine verminderte Expression <1 ab Tag eins statt. Diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur, in der beschrieben wird, dass ein erhöhter IGF-1 Spiegel positiven Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen hat und FGF-21 als sein Gegenspieler fungiert (Kap. 1.2.1.). Zusätzlich senkte eine Protein-Restriktion, welche im direkten Zusammenhang mit einer verminderten Krebsrate steht, den IGF-1 Spiegel (Levine et al., 2014). Dies verfestigt die Theorie, dass eine MetR in der Lage ist, eine Protein-Restriktion zu simulieren, da bedeutende Gene regulatorischer Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und FGF-21 in zu erwartender Art reguliert wurden.

p53 fungiert als Tumorsuppressor, kann jedoch durch seine Interaktion mit FOXO auch Einfluss auf die SIRT1-Aktivität nehmen (Nemoto et al., 2004). Zusätzlich kann die Induktion der p53-Expression den Stoffwechsel von Tumorzellen unterschiedlich regulieren und beispielsweise die Autophagie oder mTOR beeinflussen. So kann p53 neben der Unterdrückung der Glykolyse und dem entgegenwirken des Warburg-Metabolismus unter anderem Einfluss auf nachgeschaltete Proteine des IGF-Signalwegs - wie die AMPK - nehmen und so Prozesse wie das Zellwachstum, die Autophagie oder den Lipidstoffwechsel regulieren (Simabuco et al., 2018). Eine verminderte Proliferation durch MetR würde also mit einer erhöhten Expression von p53 im Einklang stehen. Dies ist auch der Fall, allerdings ist das deutlich erst nach fünf Tagen zu sehen. Das könnte daran liegen, dass die verminderte Proliferation erst rückkoppelnd p53 induziert. So kann eine aktivierte AMPK beispielsweise p53 aktivieren (El Mjiyad et al., 2011). Es konnte außerdem bereits ein Molekül namens RITA identifiziert werden, das eine Anreicherung von p53 in Tumorzellen induziert (Issaeva et al., 2004). Vielleicht gibt es

---

darüber hinaus weitere Metaboliten oder Moleküle, die bei einem LEM exprimiert werden und rückläufig und damit verzögert zu einer erhöhten Expression von p53 führen.

Zur Beurteilung der Autophagie unter MetR wurde in dieser Arbeit Map1lc3B als Marker für Autophagosomen genutzt (Kap. 3.3). Sie nehmen zelluläres Abfallmaterial wie z.B. fehlgefaltete Proteine auf, die abgebaut werden sollen. Ihr Inhalt sowie die innere Membran werden im Anschluss nach einer Fusion mit Lysosomen verdaut (Müller and Graeve, 2014). Das Ergebnis fiel allerdings nicht eindeutig aus. Zwar war nach drei Tagen eine erhöhte Expression von Map1lc3B um ca. das 3-fache (2,7-3,6 [0,8-1,3]) zu sehen, die Tage eins und fünf dagegen zeigten keine Regulierung.

Grundsätzlich lässt sich anhand der Ergebnisse aufzeigen, dass es durch MetR zu Genregulationen kommt, allerdings fallen diese nicht so eindeutig aus wie erwartet. Dies könnte daran liegen, dass sich eine MetR evtl. nicht maßgeblich auf Genexpressionsebene manifestiert, sondern sich vor allem auf Protein- oder Metabolom-Ebene äußert (Schmitz et al., 2021).

#### **4.2.2 Antiproliferative Wirkung der MetR auf die Zelllinie HeLa**

Da bei der Analyse der massenspektrometrischen Untersuchung sichergestellt werden sollte, dass die Zellen sich in einem antiproliferativen Stadium befinden, und es sich bei der verringerten Zellzahl unter MetR nicht um ein Absterben der Zellen handelt, wurde vorher eine Zellzählung durchgeführt. So sollte geprüft werden, ob die Zellzahl unter MetR konstant niedrig bleibt. Aus vorherigen Arbeiten ging hervor, dass eine MetR unter anderem auf HeLa-Zellen vermutlich antiproliferativ und nicht etwa letal oder toxisch wirkt (Koderer, 2021). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der eigenen Versuchsreihen, bei denen die Zellzahl unter MetR konstant blieb und auch nach fünf Tagen nicht weiter abnahm (Abb. 14). Kritisch zu betrachten sind einzig die geschätzten Werte an Tag vier und fünf (hier wurde nur die Hälfte der Zellen ausgesät und die Zellzahl im Nachhinein rechnerisch verdoppelt). Dieses Vorgehen wurde gewählt, um zu verhindern, dass die Zellen in der Petrischale überwachsen und somit einer Stresssituation ausgesetzt sind, die ein Ergebnis der späteren Massenspektrometrie verfälschen würden.

#### 4.2.3 Metabolismus unter MetR

Die massenspektrometrische Untersuchung der Zelllinie HeLa bot die Chance, eine Vielzahl an Metaboliten aus diversen Stoffwechselwegen auf einmal zu analysieren und dadurch einen komplexen Einblick in den Metabolismus der Zelle zu gewinnen, welcher unter fortschreitender MetR deutliche Veränderungen aufzeigte.

Beim Betrachten der Stoffgruppe der Aminosäuren in der Gesamtübersicht (Abb. 15) fiel auf, dass der Gehalt extrazellulär unter MetR anstieg, wobei er in der Kontrollgruppe kontinuierlich sank. Intrazellulär war der Aminosäuregehalt unter MetR dagegen kontinuierlich um bis zu 35% niedriger als unter Normalbedingungen. Dieses Verhalten erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich, da Aminosäuren durch eine Vielzahl an Verwendungsmöglichkeiten zum Energiehaushalt der Zelle beitragen. Jedoch ist hier - wie schon bei den ZytoTox - zu beachten, dass eine eindimensionale Zellkultur keinen Organismus simuliert. So könnte es sein, dass die Zellen unter Energiemangel – in diesem Fall die MetR – die Aminosäuren aktiv sezernieren, um sie der Leber oder benachbarten Zellen zur Verfügung zu stellen. Betrachtet man die Aminosäuren einzeln (Abb. 16), so fällt auf, dass nicht alle abnahmen. Der Gehalt einzelner blieb hoch und stieg manchmal sogar bis auf den Maximalwert an. Diese Aminosäuren scheinen eine Art Reserve zu bilden, da die Zelle sie auch unter Extrembedingungen nicht verbrauchte. So blieben intrazellulär Arginin, Glycin, Serin und Lysin unter beiden Konditionen hoch, der Gehalt an Threonin und Asparagin hingegen blieb nur unter MetR hoch. Daher sollten diesen „Reserve-Aminosäuren“ besondere Bedeutung im zellulären Stoffwechsel zugesprochen werden. So ist Arginin unter anderem an der Kreatin-, der NO-, der Ornithin- und der Citrullin-Synthese beteiligt und spielt auch bei der Polyamin-Synthese eine Rolle (Battaglia et al., 2014, Morris Jr, 2016). Die Aminosäuren Glycin und Serin können ineinander umgewandelt werden. Serin kann durch direkte Desaminierung zu Pyruvat oder durch Transaminierung zu Hydroxypyruvat verstoffwechselt werden. Zusätzlich ist auch eine weitere Umwandlung in Cystein möglich (Röhm, 2014a). Das essenzielle Lysin wird über verschiedene Wege abgebaut, die keine direkten Beziehungen zu anderen Aminosäuren erkennen lassen. Es kann einerseits zu einer Vorstufe des Acyl-Carriers Carnitin abgebaut werden, welcher für den Fetttransport in

den Mitochondrien verantwortlich ist. Andererseits kann es nach Umwandlung zu verschiedenen Zwischenstufen durch die  $\beta$ -Oxidation in Acetyl-CoA verstoffwechselt werden. Acetyl-CoA ist eine Energiequelle und kann u.a. in den Zitratzyklus eingeschleust werden. Außerdem spielt Lysin eine Rolle bei der Proteinacetylierung von Histonen (Gil et al., 2017, Röhm, 2014a).

Die essentielle Aminosäure Threonin, wird zum Großteil über  $\alpha$ -Ketobutyrat zu Propionyl-CoA verstoffwechselt, welches wiederum durch die Umwandlung in Succinyl-CoA in den Zitratzyklus eingeschleust werden kann (Röhm, 2014b, Röhm, 2014a). Threonin spielt damit eine wichtige Rolle bei den anaplerotischen Reaktionen innerhalb der Zelle. Asparagin verhielt sich ähnlich wie Threonin. Es kann durch Abspaltung von  $\text{NH}_4^+$  zu Aspartat abgebaut werden, jedoch ist der intrazelluläre Spiegel in gesunden Zellen bei genügend Energiezufuhr normalerweise niedrig (Röhm, 2014a).

Eine Proteinlimitierung oder eine unausgewogene Aminosäurezusammensetzung führt zu einer intrazellulären Aminosäure-Depletion, was die Asparagin-Synthetase-Gentranskription über einen Signalweg aktiviert, der als „Aminosäureantwort“ bezeichnet wird. Dies führt als direkte Folge zu einem Anstieg der Asparagin Konzentration und könnte auch diese unter MetR erklären (Lomelino et al., 2017).

Grundsätzlich lässt sich zusammenfassen, dass Aminosäuren wertvolle Ressourcen darstellen, weswegen die Zellen ihren Aminosäurepool unter Normalbedingungen auffüllen und ihn bei Energiemangel sezernieren, um ihn anderen lebenswichtigen Organen zur Verfügung zu stellen. Wahrscheinlich ist also, dass nur die für sie wertvollsten Aminosäuren unter MetR als Reserven behalten werden. Ob diese bei fortlaufendem Energiemangel auch sezerniert oder weiterhin gespeichert werden und warum es wirklich zur intrazellulären Akkumulation bestimmter Aminosäuren kommt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Am Ende lässt sich anhand veränderter Konzentrationen nicht sicher sagen, ob es zu einer Anhäufung, einer Synthese, zum Verbrauch oder zur Sekretion gekommen ist. Die hier verwendete Massenspektrometrie zeigt eine Momentaufnahme und gibt lediglich Auskunft über die Konzentration eines Metaboliten zum Zeitpunkt  $x$ , ohne dass sich die

Herkunft oder der weitere Syntheseweg bestimmen ließe. Nichtsdestotrotz bietet sie einen guten Ansatz, um einen Einblick in ein verändertes Metabolom zu erlangen.

Bei den Met-/Cystein-abhängigen Metaboliten gab es besonders intrazellulär Auffälligkeiten. So waren Homocystein und Cystathion unter MetR deutlich reduziert. Dies könnte daran liegen, dass ein Großteil des Homocysteins zur Met-Synthese verwendet wird. Met kann direkt aus Homocystein synthetisiert werden, dieses wird aber auch zur Cystathion-Synthese benötigt (Finkelstein and Martin, 2000), was auch dessen niedrigen Spiegel erklärt. Vermutlich wurde also ein Großteil des Homocysteins zur Regeneration von fehlendem Met benötigt, wodurch kaum noch Cystathion synthetisiert werden konnte. Auch GSH und GSSG waren unter MetR vermindert. Der Gluthation-Gehalt von Krebszellen ist besonders wichtig für den Schutz vor mutagenen Reaktionen bei der DNA-Synthese, beim Wachstum und Resistenzen gegenüber Medikamenten und Strahlung. Letztere geht in einem Malignom oft mit erhöhten GSH-Werten einher. Andersherum machen niedrigere GSH und GSSG Werte die stoffwechselaktive Krebszelle angreifbarer (Estrela et al., 2006, Fu et al., 2021). In einer „gesunden“ Zelle sollte ein leicht verringerter Spiegel an GSH und GSSG nicht sehr relevant sein, da unter MetR die Proliferations- und Stoffwechselaktivität sinkt und daher generell weniger Redoxmittel benötigt werden.

Polyamine wie Spermidin, Putrescin oder Spermin können Indikatoren für den Energiezustand einer Zelle sein. Hohe intrazelluläre Level gehen mit vermehrtem Wachstum und Proliferation einher, während niedrige Level das Gegenteil bewirken (Battaglia et al., 2014, Mandal et al., 2013). Extrazellulär verhält sich insbesondere Spermidin genau entgegengesetzt. Wie in der Einleitung beschrieben, wird durch extrazellulär aufgenommenes Spermidin die Autophagie stimuliert, was ähnlich gesundheitsfördernde Wirkung zeigt wie eine Kalorien-Restriktion (Madeo et al., 2018). Betrachtet man die Spermidin- und Putrescin-Werte aus den Metabolom-Analysen intra- sowie extrazellulär (Appendix), fallen keine großen Unterschiede auf. Die relativen Konzentrationen sind in beiden Gruppen fast identisch. Lediglich der Vorläufer von Putrescin, N-Acetyl-Putrescin ist unter MetR im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutlich

erhöht (Abb. 18). Doch wie lässt sich das erklären, da hier eher das Gegenteil zu erwarten wäre?

Es wäre möglich, dass N-Acetyl-Putrescin akkumuliert und nicht wie unter Normalbedingungen sofort zu Putrescin und Spermidin synthetisiert wird. Eventuell würden sich die Spermidin- und Putrescin-Spiegel dann mit fortlaufender MetR doch noch verringern. HeLa-Zellen müssten also vielleicht länger unter MetR gesetzt werden, um eine Senkung der Polyaminspiegel im Metabolom sichtbar zu machen.

Auch bei den „indirekt Met/Cystein abhängigen Metaboliten“ waren zwei deutlich verändert. So nahm Glucosamin unter MetR stark ab, während Glycerol-3-Phosphat signifikant zunahm (Abb. 19). Glucosamin ist ein natürlich vorkommender Aminozyucker, der normalerweise Bestandteil von Bindegewebe, Knorpel und Gelenkflüssigkeit ist. Es fällt auf, dass die Konzentration im Medium stark ansteigt, was auf eine Sekretion hindeutet. Dies könnte folgende Ursachen haben: Glucosamin könnte in die Leber transportiert werden, wo es als Regulator für FGF-21 fungieren kann. Glucosamin hat positiven Einfluss auf die FGF-21-Expression, dessen erhöhte Spiegel sich wiederum negativ auf Wachstum und Proliferation auswirken und der Zelle signalisieren, sich in Nahrungskarenz zu befinden (Chen et al., 2020, Fisher and Maratos-Flier, 2016). Zusätzlich wurde Glucosamin - wenn auch in geringem Maße - in Leberglykogen nachgewiesen (Kirkman and Whelan, 1986). Glykogen stellt einen Glukose-Speicher dar, dessen Synthese vor allem bei Glukose-Überschuss angeregt wird. Das würde implizieren, dass die Zelle trotz Energiemangel einen Glukose-Speicher anlegt und ihre Hauptstoffwechsellast evtl. auf den Fettstoffwechsel gelegt haben könnte. Dies würde auch die erhöhten Werte von Glycerol-3-Phosphat erklären, welches Ausgangsprodukt der Synthese von Glycerolipiden ist und somit eine Rolle im Lipidstoffwechsel spielt.

Auch die Metaboliten der Glykolyse könnten auf eine Stagnation des Stoffwechsels und somit auf eine Umverteilung der Stoffwechsellast hinweisen. So sind die Konzentrationen der meisten Metaboliten bis auf Lactat und Pyruvat unter MetR deutlich erhöht (Abb. 21), was auf den ersten Blick nach einer gesteigerten Glykolyse aussieht. Beim Vergleich der Menge der gesamten Kohlenhydrate mit denen der

einzelnen Metaboliten der Glykolyse, fällt aber auf, dass diese unter MetR sank. Dies weist eher darauf hin, dass der Metabolismus unter MetR stark gebremst ist und es zu einer Anhäufung der einzelnen Moleküle in der Glykolyse kommt. Auch die Tatsache, dass Lactat und Pyruvat (Endprodukte der anaeroben Glykolyse im Warburg-Metabolismus) unter MetR geringer konzentriert waren, stützt die These eines stagnierten bzw. reduzierten Stoffwechsels. Es könnte sich um einen LEM handeln, dessen Schwerpunkt sich womöglich in Richtung Fettsäure-Stoffwechsel verschoben hat.

Zuletzt soll auf die Moleküle der Kategorie „Energiewährung“ eingegangen werden (Abb. 20). Vor allem die wichtigen Energieträger ATP, GTP und NADH sind unter MetR leicht bis deutlich erhöht, was interessant ist, da bei einer Energie-Restriktion eigentlich das Gegenteil zu erwarten wäre. Allerdings ist es theoretisch möglich, dass unter MetR mTOR inhibiert wird, die Zelle in einen LEM wechselt und dadurch insgesamt weniger Energie verbraucht wird und die erhöhten Spiegel auch hier nicht auf einer Neusynthese, sondern auf einer Anstauung beruhen. Auffällig war auch der deutlich verringerte Spiegel von cAMP und mNAM. cAMP kann aus ATP synthetisiert werden und spielt als Second-messenger eine zentrale Rolle bei der Weiterleitung von Zellsignalen und reguliert insbesondere über die PKA viele physiologische und pathologische Prozesse. So kann es z.B. die Transkription von Zielgenen über die PKA regulieren oder je nach Tumor durch die cAMP-Signalübertragung fördernde oder restriktive Wirkung haben (Zhang et al., 2020a). Vielleicht kommt der niedrige Spiegel dadurch zustande, dass durch den reduzierten Stoffwechsel weniger cAMP produziert wird. Das würde die These unterstreichen, dass der erhöhte ATP-Spiegel dadurch zustanden kommt, dass schlichtweg weniger verbraucht wird.

Der niedrige Spiegel von mNAM ist nicht eindeutig zu erklären. mNAM wirkt unter anderem entzündungshemmend, thrombosehemmend und antidiabetisch. Zudem kann es vermutlich über verschiedene Mechanismen die AMPK aktivieren. So wurde eine erhöhte AMPK-Aktivität infolge eines durch mNAM gesteigerten Gehalts an reaktiver Sauerstoffspezies festgestellt und auch SIRT1 konnte durch mNAM aktiviert werden, was sich ebenfalls positiv auf die AMPK auswirkt (Nejabati et al., 2020a, Nejabati et al.,



2020b, Zhang et al., 2020b). Da die AMPK eine Unterdrückung von mTOR zur Folge hat, wäre daher eigentlich von einer gesteigerten mNAM-Konzentration unter MetR auszugehen. Das Gegenteil ist aber der Fall. mNAM wies unter MetR bis zu 70% niedrigere Werte auf (Abb. 20).

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass mNAM nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung funktioniert. Das heißt, bei hoher Stoffwechselaktivität in einem HEM würde demnach sehr viel mNAM produziert werden, was dann wiederum die AMPK aktivieren und den Stoffwechsel so rückkoppelnd wieder drosseln würde, um ein unkontrolliertes Wachstum der Zelle - entgegen der zur Verfügung stehenden Ressourcen - zu verhindern. Andersherum könnte so bei einem LEM einfach weniger mNAM produziert werden, was den niedrigen Spiegel erklären würde.

#### **4.2.4 Metaboler Fingerabdruck der MetR**

Die oben beschriebene LC/MS-Untersuchung bietet eine sehr detaillierte Momentaufnahme in den durch die MetR veränderten Stoffwechsel. Um ein besseres Verständnis für die metabolen Veränderungen erlangen zu können, bedarf es diverser Vergleiche mit anderen Zelllinien oder Restriktionsformen. Dazu könnten beispielsweise CRM oder die Restriktion anderer Aminosäuren wie Cystein gehören. Um in Zukunft effiziente Vergleiche und Überprüfungen des metabolen Verhaltens auf verschiedenen Ebenen untersuchen zu können, wurde ein metaboler Fingerabdruck der Zelllinie HeLa erstellt. Im Laufe der Analysen wurde festgestellt, dass sich bei einigen ausgewählten Metaboliten bereits nach 72 Stunden aussagekräftige Unterschiede zwischen beiden Vergleichsgruppen herauskristallisierten. Daher wurde ein spezifisches Zellprofil aus knapp 50 Metaboliten erstellt. In diesem „Fingerprint“ wurden nur die Tage eins und drei gegenübergestellt. Schon hier wurde deutlich, dass die meisten Aminosäuren unter MetR sinken, Asparagin und Threonin aber beispielsweise steigen. Auch das verringerte Level an GSH war nach 72 Stunden zu erkennen und auch die Tendenz der Energieträger zur Akkumulation zeichnete sich bereits ab.

Vergleicht man nun aber die massenspektrometrischen Untersuchungen dieser Dissertation mit der von L929-Zellen unter gleichen Bedingungen aus der vorangegangenen Arbeit (Koderer, 2021), werden einige Unterschiede deutlich.

Betrachtet man zunächst die Übersichten der Stoffgruppen, fällt auf, dass die Tendenzen vor allem bei den Aminosäuren und den Kohlenhydraten sehr ähnlich sind und eine MetR die Konzentrationen in beiden Zelllinien deutlich verringert. Bei den anderen Stoffgruppen kommt es in HeLa-Zellen jedoch lediglich zu einem leicht verringerten Anstieg unter MetR im Vergleich zur Kontrollgruppe, im Gegensatz zu den L929-Zellen, wo es sogar zu einem Abfall kommt. Auch der metabolische Fingerabdruck lässt sich nicht ohne weiteres gleichsetzen. Wo bei L929-Zellen schon nach 48 Stunden deutliche Unterschiede zu sehen waren, benötigte es bei HeLa-Zellen mindestens 72 Stunden, um aussagekräftige Veränderungen zu sehen. Die HeLa-Zellen schienen langsamer auf eine MetR zu reagieren. Dies könnte daran liegen, dass der Stoffwechsel humaner Zellen langsamer ist als der einer murinen Zelle (Melzer et al., 2016, Speakman, 2005, National Research Council, 1995). So könnten HeLa-Zellen in zukünftigen Experimenten über einen längeren Zeitraum hinweg unter MetR inkubiert werden, um deutlichere Ergebnisse zu erhalten.

Da massenspektrometrische Untersuchungen aufwändig und teuer sind, bieten sie für schnelle Vergleiche und Analysen oft nicht den richtigen Rahmen. Aus diesem Grund wurde im Zuge der durch Corinna Koderer durchgeführten Massenspektrometrie noch eine weitere Gruppe an Metaboliten definiert, die als „Footprint“ bezeichnet wird. Diese Gruppe enthält nur eine geringe Anzahl an Molekülen, die sich aber in der Summe zur Analyse einer MetR bzw. eines LEM qualifizieren. Die Kombination bestand aus folgenden Metaboliten: Acetoacetat, Kreatin, Spermidin und dem Verhältnis von ATP/ADP. Dieser „Footprint“ sollte eine Art „Fast-Tracking“-Methode möglich machen, bei der alternative Messmethoden (wie z.B. ELISA) angewandt werden, durch die kostengünstiger und schneller überprüft werden kann, ob z.B. Aminosäure-Analoga oder CRM einen LEM induzieren (Schmitz et al., 2021).

Beim Vergleich des „L929-Footprints“ mit denselben Metaboliten der Zelllinie HeLa unter gleichen Bedingungen (Abb. 24) fiel allerdings auf, dass kaum einer der ausgewählten Metaboliten ähnliche Tendenzen zeigte. Definiert man den LEM also anhand des „L929-Footprints“, würde man zu dem Schluss kommen, dass eine MetR bei HeLa-Zellen - zumindest über einen Zeitraum von fünf Tagen - keinen LEM induziert.

Dabei ist zu beachten, dass sich HeLa- und L929-Zellen in vielerlei Hinsicht deutlich voneinander unterscheiden und nicht so einfach gleichzusetzen sind. So sind L929-Zellen murine Fibroblastenzellen und HeLa-Zellen humane Krebszellen. Abgesehen davon, dass es sich hier um zwei unterschiedliche Spezies handelt, verhalten sich Krebszellen aufgrund von Resistenzen und Mutationen oftmals anders als gesunde proliferative Zellen. Auch wenn diese ebenfalls den Warburg-Metabolismus nutzen, sind sie daher nicht direkt mit Krebszellen gleichzusetzen. Gerade deswegen müssen die unterschiedlichen Ergebnisse nicht gleichsam bedeuten, dass kein LEM induziert wurde. Darum wurde ein eigener „Footprint“ aus fünf anderen Metaboliten erstellt, welche charakteristisch für die Stoffwechselveränderungen der HeLa-Zellen stehen. Dieser setzt sich - wie in Kap. 3.4.4 bereits beschrieben - aus der Kombination der Metaboliten N-Acetyl-Putrescin, Glucosamin, Glycerol-3-Phosphat, cAMP und mNAM zusammen. All diese Metaboliten zeigten auch nach kürzerer Zeit (72 h) unter MetR deutliche Konzentrationsunterschiede. Es könnte also künftig anhand dieser fünf Marker speziell für HeLa mit Hilfe der vorgeschlagenen „Fast-Tracking“-Methoden analysiert werden, ob andere Restriktionsformen den gleichen metabolen Fußabdruck hervorrufen. Zusätzlich bestünde noch die Möglichkeit, das Sekretionsverhalten der Aminosäuren zu bestimmen.

Abschließend lässt sich sagen, dass viele Tendenzen darauf hinweisen, dass ein LEM induziert werden kann und dass vermutlich der Faktor Zeit, beim Vergleich zwischen einem murinen und humanen Stoffwechsel, der ausschlaggebende Punkt ist, warum sich dieser LEM nicht so eindeutig manifestiert. Definiert man allerdings den „Footprint“ der L929-Zellen als Standard, müsste davon ausgegangen werden, dass kein LEM induziert wurde, wobei hier die unterschiedliche Stoffwechselgeschwindigkeit bei verschiedenen Spezies außer Acht gelassen wäre. Es wäre theoretisch auch möglich, dass sich ein LEM bei humanen Zellen auf metabolischer Ebene anders ausdrückt. Um dies zu klären, bedarf es weiterer LC/MS-Untersuchungen mit weiteren Zelllinien wie beispielsweise HaCaT oder den HNSCC-Linien. Diese können Aufschluss darüber geben, ob es sich tatsächlich um einen LEM handelt und ob es nur ein rein human/muriner Unterschied ist oder ob der LEM zellspezifisch in jeder Zellart oder auch nur Krebszellart

anders bzw. neu definiert werden muss. Zumindest durch den augenscheinlichen Stillstand der Glykolyse und den deutlich verminderten Werten an Lactat und Pyruvat unter MetR ist aber davon auszugehen, dass der Warburg-Metabolismus reduziert wurde.

### **4.3 Kalorien-Restriktions-Mimetika als potenzielle Therapieoption**

CRM können auf verschiedenen Wegen zu einer Hemmung von mTOR beitragen und haben somit das Potenzial, einen LEM zu induzieren (Kap. 1.5). Zudem stellt die Vorstellung, die Effekte einer Kalorien-Restriktion nur durch ein einziges Medikament erzielen zu können einen vielversprechenden Ansatz in der Krebstherapie dar. Doch welche Mittel eignen sich hierfür am besten, wo doch die Signalkaskade, die zu einer Hemmung von mTOR führt, an diversen Stellen durch unterschiedlichste Einflüsse aktiviert werden kann?

Die Überlegung bestand darin, sich mit Substanzen zu beschäftigen, die bereits auf dem freien Markt zur Verfügung stehen und dessen Potenzial neu zu eruieren. Wie Metformin, das meistverwendete Diabetes-Typ-II-Medikament, welches sowohl in der Krebstherapie Anwendung findet als auch in der Lage dazu ist, auf molekularer Ebene mTOR zu hemmen (Del Barco et al., 2011, Dong et al., 2012, Novelle et al., 2016) und das Nahrungsergänzungsmittel NAD<sup>+</sup>, welches durch seine Interaktion mit den Sirtuinen (Kap 1.5) ebenfalls das Potenzial aufweist, einen LEM zu induzieren.

Da der Schwerpunkt in der Krebsforschung der Arbeitsgruppe in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie auf dem oralen Plattenepithelkarzinom liegt, sollten hier neben L929, HeLa und HaCaT auch die vier HNSCC-Linien untersucht werden. Dafür wurden sie mit Metformin- /NAD<sup>+</sup> - Verdünnungsreihen inkubiert und in Proliferationsstudien mittels ZytoTox analysiert.

Sowohl Metformin als auch NAD<sup>+</sup> wirkten mit steigender Konzentration antiproliferativ. Die relative Zellzahl aller HNSCC-Zelllinien war bei einer Konzentration von 2,5 mM Metformin etwa um 40-50% reduziert und auch HeLa und HaCaT zeigten sich ähnlich sensitiv. Einzig L929 tolerierte gut die doppelte Menge an Metformin (Abb. 12). Daraus lässt sich schließen, dass in zukünftigen Versuchen - wie z.B. einer Massenspektrometrie - mit einer dauerhaften Metforminkonzentration von 2,5 mM gearbeitet werden

---

könnte, die stark antiproliferativ wirkt. Ähnlich verhielt es sich bei NAD<sup>+</sup>, wobei die Zellen sich hier im Schnitt schon bei ca. 0,5 mM um 30-50% reduzierten (Abb. 13). Einzig SCC9 schien weniger sensitiv auf NAD<sup>+</sup> zu reagieren. Auch hier könnten die Verdünnungsreihen bei Konzentrationsfindungen (in diesem Fall 0,5 mM NAD<sup>+</sup>) als Orientierungspunkt für kommende Versuche dienen. Aus den Versuchen ging aber nicht eindeutig hervor, ob diese Dosen toxisch wirkten und die Zellen abstarben oder ob lediglich die Proliferation gestoppt wurde. Das ZytoTox-Verfahren gibt lediglich Auskunft über die relative Zellzahl. Darum sollten dahingehend weitere Versuche folgen, in denen die Toxizität bzw. Verträglichkeit untersucht werden.

#### **4.4 Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass eine vollständige Glukose-Restriktion letal auf die untersuchten Zellen wirkte, eine konstant niedrigere Glukosekonzentration sie aber für Liganden oder Medikamente sensitivieren kann. Außerdem wirkten Metformin, NAD<sup>+</sup> und eine MetR antiproliferativ auf die analysierten Zellen. Letztere hat zudem Einfluss auf die Genexpression, äußert sich aber vor allem im metabolen Profil. So waren bei den HeLa-Zellen unter MetR eindeutige Veränderungen im Metabolismus erkennbar. Der Vergleich der LC/MS der HeLa-Linie mit dem Metabolom der L929-Zellen wies sowohl Gemeinsamkeiten (Aminosäuresekretion) als auch deutliche Unterschiede auf („Footprint“-Metaboliten). Die Frage, ob bei HeLa-Zellen nach fünf Tagen MetR ein LEM induziert wird, kann in der Tendenz bejaht werden. Betrachtet man den „Footprint“ der L929-Zellen als Referenz, ist wahrscheinlich, dass der LEM zell- bzw. speziesspezifisch immer neu definiert werden muss und dass auch der Faktor „Zeit“ entscheidend ist. Dies wird sich in zukünftigen Experimenten abschließend klären lassen.

Zukünftig sollten sowohl der MetR als auch der Glukose-Restriktion weitere Aufmerksamkeit geschenkt werden, zudem sollten in weiterführenden Versuchen vor allem HNSCC-Zellen untersucht werden, da diese den Schwerpunkt der Arbeitsgruppe darstellen. Hierfür sollten die hier durchgeführten Versuche als Modellversuche und Vergleiche dienen.

Der „Fingerprint“ von HeLa wies neben dem möglichen LEM auch auf einen gehemmten Warburg-Metabolismus hin. Glykolytische Inhibitoren und die Glukose-Restriktion sind effektiv gegen das Tumorwachstum und wirken dem Warburg-Metabolismus vermutlich auch entgegen (Geschwind et al., 2002, Rosbe et al., 1989, Tahtouh et al., 2019). Interessant wäre es daher eine weitere LC/MS-Untersuchungen unter Glukose-Restriktion durchzuführen. Hierbei sollte überprüft werden, ob ein LEM induziert werden und ob dem Warburg-Metabolismus entgegengewirkt werden kann. Dies ließe sich am effektivsten mit Hilfe isotoopenmarkierter Glukose umsetzen, wodurch sich anschließend eine Fließanalyse erstellen ließe. Das würde Aufschluss über die Stoffwechselwege der Glukose geben und in vielen Fällen auch Klarheit darüber bringen, ob Metaboliten neu synthetisiert oder nur angestaut wurden. Neben der Glukose-Restriktion sollten weitere massenspektrometrische Versuche unter MetR mit HNSCC-Zellen stattfinden. Hierdurch erhält man die Erkenntnis darüber, ob ein LEM zellspezifisch oder speziesspezifisch ist, oder ob er sich doch am L929-Modellsystem messen lässt. Des Weiteren sollte in Experimenten die Toxizität von Metformin und NAD<sup>+</sup> untersucht werden, um das Potenzial dieser CRM weiter auszuschöpfen.

## 5 Zusammenfassung

Die Krebserkrankung und ihre Therapieoptionen sind - in sozioökonomischer, physischer und psychischer Hinsicht - bis zum heutigen Zeitpunkt eine große Belastung in unserer Gesellschaft. Obwohl es stets Fortschritte in der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten maligner Erkrankungen gibt, stellt ihre Behandlung auch in der modernen Medizin noch eine enorme Herausforderung dar. Darum besteht bis heute ein hoher Bedarf an neuen oder weiterentwickelten Behandlungsmöglichkeiten.

Um die Proliferation einer neoplastischen Zelle zu beeinflussen, stellen die Biomasse und die Energie einen grundlegenden Ansatz dar. Hier bieten sich vor allem die Aminosäuren als wesentlicher Baustein der Zellmasse und der bedeutende Energieträger „Glukose“ an, wodurch sich die beiden grundsätzlichen Ansätze einer Protein- bzw. Aminosäure-Restriktion und einer Glukose-Restriktion ergeben. Ziel ist es durch gezielte Veränderungen der Stoffwechsellage, die Zelle in einen Low-Energy-Metabolismus zu versetzen. Dieser versetzt die Zelle in einen sich selbst regenerierenden, antiproliferativen Zustand.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die beiden Ansätze grundsätzlich als Therapieform gegen das Plattenepithelkarzinom (HNSCC) eignen. Zusätzlich sollte ein einfaches Modell einer humanen Zelllinie erstellt werden, mit Hilfe dessen sich ein Low-Energy-Metabolismus auf metaboler Ebene charakterisieren und analysieren lässt.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine konstante Glukose-Restriktion die Zellen teils sensitiver auf Todesliganden reagieren lassen. Außerdem wirken Kalorien-Restriktions-Mimetika antiproliferativ auf HNSCC-Zellen und bieten somit weitere Möglichkeiten in der Krebstherapie. Hinzu kommt, dass eine Methionin-Restriktion Einfluss auf die Genexpression jener Gene hat, die mit der Low-Energy-Metabolismus-Signalkaskade in Zusammenhang stehen. Zuletzt lieferte die massenspektrometrische Analyse von mehr als 150 Metaboliten der humanen Zelllinie HeLa durch LC/MS ein detailliertes Bild ihres Metabolismus unter Methionin-Restriktion. Durch die Definition eines charakteristischen Fingerabdrucks nach 72 h und eines kleinen Fußabdrucks aus wenigen Metaboliten, konnte ein humanes Modellsystem etabliert werden, das zukünftig u.a. die schnelle Analyse von Kalorien-Restriktions-Mimetika ermöglicht.

## 6 Literaturverzeichnis

- ABLES, G. P., HENS, J. R. & NICHENAMETLA, S. N. 2016. Methionine restriction beyond life-span extension. *Ann N Y Acad Sci*, 1363, 68-79.
- ANDERSON, C., LOTH, E., OPAT, E., BODEKER, K., AHMANN, L., PARKHURST, J., SUN, W., FURQAN, M., LAUX, D. & BROWN, H. 2016. A Phase 1 Trial of Ketogenic Diet With Concurrent Chemoradiation (CRT) in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics*, 94, 898.
- BALL, Z. B., BARNES, R. H. & VISSCHER, M. B. 1947. The effects of dietary caloric restriction on maturity and senescence, with particular reference to fertility and longevity. *Am J Physiol*, 150, 511-9.
- BATTAGLIA, V., SHIELDS, C. D., MURRAY-STEWART, T. & CASERO, R. A. 2014. Polyamine catabolism in carcinogenesis: potential targets for chemotherapy and chemoprevention. *Amino acids*, 46, 511-519.
- BONKOWSKI, M. S. & SINCLAIR, D. A. 2016. Slowing ageing by design: the rise of NAD(+) and sirtuin-activating compounds. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17, 679-690.
- BOUDEAU, J., SAPKOTA, G. & ALESSI, D. R. 2003. LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. *FEBS letters*, 546, 159-165.
- BRANDT, B. & PETRIDES, P. E. 2014. Spezifische Tumore–Entstehung, Progression und Therapie. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer.
- BRIX, J., KOCH, H.-G. & HEINRICH, P. C. 2014. Regulation der Transkription–Aktivierung und Inaktivierung der Genexpression. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer.
- BROWN-BORG, H. M. & BARTKE, A. 2012. GH and IGF1: roles in energy metabolism of long-living GH mutant mice. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 67, 652-660.
- CANTÓ, C., GERHART-HINES, Z., FEIGE, J. N., LAGOUGE, M., NORIEGA, L., MILNE, J. C., ELLIOTT, P. J., PUIGSERVER, P. & AUWERX, J. 2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458, 1056-1060.
- CAVUOTO, P. & FENECH, M. F. 2012. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer treatment reviews*, 38, 726-736.
- CELLARIER, E., DURANDO, X., VASSON, M., FARGES, M., DEMIDEN, A., MAURIZIS, J., MADELMONT, J. & CHOLLET, P. 2003. Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer treatment reviews*, 29, 489-499.
- CHATURVEDI, S., HOFFMAN, R. M. & BERTINO, J. R. 2018. Exploiting methionine restriction for cancer treatment. *Biochemical pharmacology*, 154, 170-173.
- CHEN, T. Y., SUN, D., LIN, W. S., LIN, Y. L., CHAO, Y. M., CHEN, S. Y., CHEN, Y. R. & WU, Y. L. 2020. Glucosamine regulation of fibroblast growth factor 21 expression in liver and adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 529, 714-719.
- CHEN, Y., ZHUANG, H., CHEN, X., SHI, Z. & WANG, X. 2018. Spermidine-induced growth inhibition and apoptosis via autophagic activation in cervical cancer. *Oncology reports*, 39, 2845-2854.



- CHOW, L. Q. 2020. Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382, 60-72.
- CHUA, S. C., GROVES, A. M., KAYANI, I., MENEZES, L., GACINOVIC, S., DU, Y., BOMANJI, J. B. & ELL, P. J. 2007. The impact of 18 F-FDG PET/CT in patients with liver metastases. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 34, 1906-1914.
- CHUANG, S. C., JENAB, M., HECK, J. E., BOSETTI, C., TALAMINI, R., MATSUO, K., CASTELLSAGUE, X., FRANCESCHI, S., HERRERO, R., WINN, D. M., LA VECCHIA, C., MORGENSTERN, H., ZHANG, Z. F., LEVI, F., DAL MASO, L., KELSEY, K., MCCLEAN, M. D., VAUGHAN, T., LAZARUS, P., MUSCAT, J., RAMROTH, H., CHEN, C., SCHWARTZ, S. M., ELUF-NETO, J., HAYES, R. B., PURDUE, M., BOCCIA, S., CADONI, G., ZARIDZE, D., KOIFMAN, S., CURADO, M. P., AHRENS, W., BENHAMOU, S., MATOS, E., LAGIOU, P., SZESZENIA-DABROWSKA, N., OLSHAN, A. F., FERNANDEZ, L., MENEZES, A., AGUDO, A., DAUDT, A. W., MERLETTI, F., MACFARLANE, G. J., KJAERHEIM, K., MATES, D., HOLCATOVA, I., SCHANTZ, S., YU, G. P., SIMONATO, L., BRENNER, H., MUELLER, H., CONWAY, D. I., THOMSON, P., FABIANOVA, E., ZNAOR, A., RUDNAI, P., HEALY, C. M., FERRO, G., BRENNAN, P., BOFFETTA, P. & HASHIBE, M. 2012. Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Causes Control*, 23, 69-88.
- CODOGNO, P. & MEIJER, A. 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death & Differentiation*, 12, 1509-1518.
- CURADO, M. P. & BOYLE, P. 2013. Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol. *Curr Opin Oncol*, 25, 229-34.
- D'SOUZA, G., KREIMER, A. R., VISCIDI, R., PAWLITA, M., FAKHRY, C., KOCH, W. M., WESTRA, W. H. & GILLISON, M. L. 2007. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 356, 1944-1956.
- DANIEL, H. & WENZEL, U. 2014. Energiebilanz und Ernährungszustand. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer.
- DAYYANI, F., ETZEL, C. J., LIU, M., HO, C.-H., LIPPMAN, S. M. & TSAO, A. S. 2010. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head & neck oncology*, 2, 1-11.
- DEL BARCO, S., VAZQUEZ-MARTIN, A., CUFÍ, S., OLIVERAS-FERRAROS, C., BOSCH-BARRERA, J., JOVEN, J., MARTIN-CASTILLO, B. & MENENDEZ, J. A. 2011. Metformin: multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget*, 2, 896.
- DENTON, D. & KUMAR, S. 2019. Autophagy-dependent Cell Death. *Cell death and differentiation*, 26, 605-616.
- DONG, L., ZHOU, Q., ZHANG, Z., ZHU, Y., DUAN, T. & FENG, Y. 2012. Metformin sensitizes endometrial cancer cells to chemotherapy by repressing glyoxalase I expression. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 38, 1077-1085.
- DOWLING, R. J., ZAKIKHANI, M., FANTUS, I. G., POLLAK, M. & SONENBERG, N. 2007. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer research*, 67, 10804-10812.

- DWARAKANATH, B. S., SINGH, S. & JAIN, V. 1999. Optimization of tumour radiotherapy: Part V--Radiosensitization by 2-deoxy-D-glucose and DNA ligand Hoechst-33342 in a murine tumour. *Indian J Exp Biol*, 37, 865-70.
- EDEN, E., GEVA-ZATORSKY, N., ISSAEVA, I., COHEN, A., DEKEL, E., DANON, T., COHEN, L., MAYO, A. & ALON, U. 2011. Proteome half-life dynamics in living human cells. *Science*, 331, 764-768.
- EGLER, V., KORUR, S., FAILLY, M., BOULAY, J. L., IMBER, R., LINO, M. M. & MERLO, A. 2008. Histone deacetylase inhibition and blockade of the glycolytic pathway synergistically induce glioblastoma cell death. *Clin Cancer Res*, 14, 3132-40.
- EHRENFELD, M., PREIN, J. & JUNDT, G. 2011. Tumoren und tumorähnliche Läsionen im Mund-Kiefer-Gesichts-Bereich. *Schwenzer N, Ehrenfeld M, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*, 4, 82-88.
- EL-MIR, M.-Y., NOGUEIRA, V., FONTAINE, E., AVÉRET, N., RIGOULET, M. & LEVERVE, X. 2000. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 223-228.
- EL MIJYAD, N., CARO-MALDONADO, A., RAMIREZ-PEINADO, S. & MUNOZ-PINEDO, C. 2011. Sugar-free approaches to cancer cell killing. *Oncogene*, 30, 253-264.
- ERICES, R., BRAVO, M. L., GONZALEZ, P., OLIVA, B., RACORDON, D., GARRIDO, M., IBAÑEZ, C., KATO, S., BRAÑES, J. & PIZARRO, J. 2013. Metformin, at concentrations corresponding to the treatment of diabetes, potentiates the cytotoxic effects of carboplatin in cultures of ovarian cancer cells. *Reproductive sciences*, 20, 1433-1446.
- ESCOBAR, K. A., COLE, N. H., MERMIER, C. M. & VANDUSSELDORP, T. A. 2019. Autophagy and aging: Maintaining the proteome through exercise and caloric restriction. *Aging cell*, 18, e12876.
- ESTRELA, J. M., ORTEGA, A. & OBRADOR, E. 2006. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 43, 143-81.
- FERLAY, J., STELIAROVA-FOUCHER, E., LORTET-TIEULENT, J., ROSSO, S., COEBERGH, J. W., COMBER, H., FORMAN, D. & BRAY, F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49, 1374-403.
- FÎLFAN, M., SANDU, R. E., ZAVALEANU, A. D., GRESITA, A., GLAVAN, D. G., OLARU, D.-G. & POPA-WAGNER, A. 2017. Autophagy in aging and disease. *Rom J Morphol Embryol*, 58, 27-31.
- FINKELSTEIN, J. D. & MARTIN, J. J. 2000. Homocysteine. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 32, 385-389.
- FISHER, F. M. & MARATOS-FLIER, E. 2016. Understanding the physiology of FGF21. *Annual review of physiology*, 78, 223-241.
- FONTANA, L., ADELAIYE, R. M., RASTELLI, A. L., MILES, K. M., CIAMPORCERO, E., LONGO, V. D., NGUYEN, H., VESSELLA, R. & PILI, R. 2013. Dietary protein restriction inhibits tumor growth in human xenograft models of prostate and breast cancer. *Oncotarget*, 4, 2451.
- FORETZ, M., GUIGAS, B., BERTRAND, L., POLLAK, M. & VIOLLET, B. 2014. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell metabolism*, 20, 953-966.

- FU, L. H., WAN, Y., QI, C., HE, J., LI, C., YANG, C., XU, H., LIN, J. & HUANG, P. 2021. Nanocatalytic Theranostics with Glutathione Depletion and Enhanced Reactive Oxygen Species Generation for Efficient Cancer Therapy. *Adv Mater*, 33, e2006892.
- GALLUZZI, L., SENOVILLA, L., VITALE, I., MICHELS, J., MARTINS, I., KEPP, O., CASTEDO, M. & KROEMER, G. 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31, 1869-1883.
- GAO, X., SANDERSON, S. M., DAI, Z., REID, M. A., COOPER, D. E., LU, M., RICHIE, J. P., CICCARELLA, A., CALCAGNOTTO, A. & MIKHAEL, P. G. 2019. Dietary methionine influences therapy in mouse cancer models and alters human metabolism. *Nature*, 572, 397-401.
- GATENBY, R. A. & GILLIES, R. J. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews cancer*, 4, 891-899.
- GESCHWIND, J.-F. H., KO, Y. H., TORBENSON, M. S., MAGEE, C. & PEDERSEN, P. L. 2002. Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer research*, 62, 3909-3913.
- GIL, J., RAMÍREZ-TORRES, A. & ENCARNACIÓN-GUEVARA, S. 2017. Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective. *J Proteomics*, 150, 297-309.
- GILLESPIE, Z. E., PICKERING, J. & ESKIW, C. H. 2016. Better living through chemistry: caloric restriction (CR) and CR mimetics alter genome function to promote increased health and lifespan. *Frontiers in genetics*, 7, 142.
- GILLISON, M. L., CHATURVEDI, A. K., ANDERSON, W. F. & FAKHRY, C. 2015. Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology*, 33, 3235.
- GILLISON, M. L., D'SOUZA, G., WESTRA, W., SUGAR, E., XIAO, W., BEGUM, S. & VISCIDI, R. 2008. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 100, 407-420.
- GILLISON, M. L., KOCH, W. M., CAPONE, R. B., SPAFFORD, M., WESTRA, W. H., WU, L., ZAHURAK, M. L., DANIEL, R. W., VIGLIONE, M. & SYMER, D. E. 2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 709-720.
- GILLISON, M. L. & SHAH, K. V. 2001. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Current opinion in oncology*, 13, 183-188.
- GOBERDHAN, D. C., WILSON, C. & HARRIS, A. L. 2016. Amino acid sensing by mTORC1: intracellular transporters mark the spot. *Cell metabolism*, 23, 580-589.
- GOSEKI, N. & NAGAHAMA, T. 2001. Anti-methionine cancer chemotherapy: L-methionine and its potential effects for cancer therapy. *Nutritional Support in Cancer and Transplant Patients*. CRC Press.
- GU, X., OROZCO, J. M., SAXTON, R. A., CONDON, K. J., LIU, G. Y., KRAWCZYK, P. A., SCARIA, S. M., HARPER, J. W., GYGI, S. P. & SABATINI, D. M. 2017. SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*, 358, 813-818.

- GULATI, S., DESAI, J., PALACKDHARRY, S. M., MORRIS, J. C., ZHU, Z., JANDAROV, R., RIAZ, M. K., TAKIAR, V., MIERZWA, M., GUTKIND, J. S., MOLINOLO, A., DESAI, P. B., SADRAEI, N. H. & WISE-DRAPER, T. M. 2020. Phase 1 dose-finding study of metformin in combination with concurrent cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced head and neck squamous cell cancer. *Cancer*, 126, 354-362.
- HAWLEY, S. A., GADALLA, A. E., OLSEN, G. S. & HARDIE, D. G. 2002. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes*, 51, 2420-2425.
- HENS, J., SINHA, I., PERODIN, F., COOPER, T., SINHA, R., PLUMMER, J., PERRONE, C. & ORENTREICH, D. 2016. Methionine-restricted diet inhibits growth of MCF10AT1-derived mammary tumors by increasing cell cycle inhibitors in athymic nude mice. *BMC cancer*, 16, 1-13.
- HERNLUND, E., HJERPE, E., AVALL-LUNDQVIST, E. & SHOSHAN, M. 2009. Ovarian carcinoma cells with low levels of beta-F1-ATPase are sensitive to combined platinum and 2-deoxy-D-glucose treatment. *Mol Cancer Ther*, 8, 1916-23.
- HOBDELL, M., OLIVEIRA, E., BAUTISTA, R., MYBURGH, N., LALLOO, R., NARENDRAN, S. & JOHNSON, N. 2003. Oral diseases and socio-economic status (SES). *British dental journal*, 194, 91-96.
- HOSHIYA, Y., GUO, H., KUBOTA, T., INADA, T., ASANUMA, F., YAMADA, Y., KOH, J., KITAJIMA, M. & HOFFMAN, R. 1995. Human tumors are methionine dependent in vivo. *Anticancer research*, 15, 717-718.
- HOSIOS, A. M., HECHT, V. C., DANAI, L. V., JOHNSON, M. O., RATHMELL, J. C., STEINHAUSER, M. L., MANALIS, S. R. & VANDER HEIDEN, M. G. 2016. Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell*, 36, 540-9.
- HUANG, S. H. & O'SULLIVAN, B. 2017. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol*, 18, 40.
- HUNT, J. L., BARNES, L., LEWIS, J. S., MAHFOUZ, M. E., SLOOTWEG, P. J., THOMPSON, L. D., CARDESA, A., DEVANEY, K. O., GNEPP, D. R. & WESTRA, W. H. 2014. Molecular diagnostic alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck and potential diagnostic applications. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 271, 211-223.
- HUNTER, K. D., PARKINSON, E. K. & HARRISON, P. R. 2005. Profiling early head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5, 127-135.
- IGARASHI, K. & KASHIWAGI, K. 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42, 39-51.
- ILIOPOULOS, D., HIRSCH, H. A. & STRUHL, K. 2011. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer research*, 71, 3196-3201.
- ISSAEVA, N., BOZKO, P., ENGE, M., PROTOPOPOVA, M., VERHOEF, L. G. G. C., MASUCCI, M., PRAMANIK, A. & SELIVANOVA, G. 2004. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nature Medicine*, 10, 1321-1328.

- JOHNSON, N. W., WARNAKULASURIYA, S., GUPTA, P., DIMBA, E., CHINDIA, M., OTOH, E., SANKARANARAYANAN, R., CALIFANO, J. & KOWALSKI, L. 2011. Global oral health inequalities in incidence and outcomes for oral cancer: causes and solutions. *Advances in dental research*, 23, 237-246.
- KHARITONENKOV, A., SHIYANOVA, T. L., KOESTER, A., FORD, A. M., MICANOVIC, R., GALBREATH, E. J., SANDUSKY, G. E., HAMMOND, L. J., MOYERS, J. S. & OWENS, R. A. 2005. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of clinical investigation*, 115, 1627-1635.
- KILBURN, D., LILLY, M. & WEBB, F. 1969. The energetics of mammalian cell growth. *Journal of cell science*, 4, 645-654.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B. & GUAN, K.-L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*, 13, 132-141.
- KIRKMAN, B. R. & WHELAN, W. J. 1986. Glucosamine is a normal component of liver glycogen. *FEBS Lett*, 194, 6-11.
- KLIONSKY, D. J., ABDELMOHSEN, K., ABE, A., ABEDIN, M. J., ABELIOVICH, H., AROZENA, A. A., ADACHI, H., ADAMS, C. M., ADAMS, P. D. & ADELI, K. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 12, 1-222.
- KO, Y. H., SMITH, B. L., WANG, Y., POMPER, M. G., RINI, D. A., TORBENSON, M. S., HULLIHEN, J. & PEDERSEN, P. L. 2004. Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochemical and biophysical research communications*, 324, 269-275.
- KODERER, C. 2021. *In Vitro Analyse der Methionin-Restriktion im murinen Modellsystem L929 sowie im Plattenepithelkarzinom – HNSCC*. Dissertation Julius-Maximilian-Universität Würzburg.
- KOMNINO, D., LEUTZINGER, Y., REDDY, B. S. & RICHIE JR, J. P. 2006. Methionine restriction inhibits colon carcinogenesis. *Nutrition and cancer*, 54, 202-208.
- KÖNIG, M., BULIK, S. & HOLZHÜTTER, H.-G. 2012. Quantifying the contribution of the liver to glucose homeostasis: a detailed kinetic model of human hepatic glucose metabolism. *PLoS computational biology*, 8, e1002577.
- LARON, Z. 2001. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Molecular Pathology*, 54, 311.
- LEVINE, M. E., SUAREZ, J. A., BRANDHORST, S., BALASUBRAMANIAN, P., CHENG, C.-W., MADIA, F., FONTANA, L., MIRISOLA, M. G., GUEVARA-AGUIRRE, J. & WAN, J. 2014. 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 metabolism*, 19, 407-417.
- LIBERTI, M. V. & LOCASALE, J. W. 2016. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends in biochemical sciences*, 41, 211-218.
- LIM, C. T., KOLA, B. & KORBONITS, M. 2010. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *Journal of molecular endocrinology*, 44, 87.
- LIM, Y. C., KOO, B. S., LEE, J. S., LIM, J. Y. & CHOI, E. C. 2006. Distributions of cervical lymph node metastases in oropharyngeal carcinoma: therapeutic implications for the NO neck. *The Laryngoscope*, 116, 1148-1152.

- LIU, M., CAO, H., HOU, Y., SUN, G., LI, D. & WANG, W. 2018. Liver plays a major role in FGF-21 mediated glucose homeostasis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45, 1423-1433.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25, 402-408.
- LIZCANO, J. M., GÖRANSSON, O., TOTH, R., DEAK, M., MORRICE, N. A., BOUDEAU, J., HAWLEY, S. A., UDD, L., MÄKELÄ, T. P. & HARDIE, D. G. 2004. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO journal*, 23, 833-843.
- LOCASALE, J. W. & CANTLEY, L. C. 2011. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell metabolism*, 14, 443-451.
- LÖFFLER, G. & MÜLLER, M. 2014. Glucose–Schlüsselmolekül des Kohlenhydratstoffwechsels. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer.
- LOMELINO, C. L., ANDRING, J. T., MCKENNA, R. & KILBERG, M. S. 2017. Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. *J Biol Chem*, 292, 19952-19958.
- LONG, X., LIN, Y., ORTIZ-VEGA, S., YONEZAWA, K. & AVRUCH, J. 2005. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current biology*, 15, 702-713.
- MADEO, F., CARMONA-GUTIERREZ, D., HOFER, S. J. & KROEMER, G. 2019. Caloric restriction mimetics against age-associated disease: targets, mechanisms, and therapeutic potential. *Cell metabolism*, 29, 592-610.
- MADEO, F., EISENBERG, T., PIETROCOLA, F. & KROEMER, G. 2018. Spermidine in health and disease. *Science*, 359.
- MALLOY, V. L., KRAJCIK, R. A., BAILEY, S. J., HRISTOPOULOS, G., PLUMMER, J. D. & ORENTREICH, N. 2006. Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging cell*, 5, 305-314.
- MANDAL, S., MANDAL, A., JOHANSSON, H. E., ORJALO, A. V. & PARK, M. H. 2013. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 2169-2174.
- MASTERNAK, M. M. & BARTKE, A. 2012. Growth hormone, inflammation and aging. *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases*, 2, 17293.
- MATTISON, J. A., COLMAN, R. J., BEASLEY, T. M., ALLISON, D. B., KEMNITZ, J. W., ROTH, G. S., INGRAM, D. K., WEINDRUCH, R., DE CABO, R. & ANDERSON, R. M. 2017. Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nature communications*, 8, 1-12.
- MELZER, K., HEYDENREICH, J., SCHUTZ, Y., RENAUD, A., KAYSER, B. & MÄDER, U. 2016. Metabolic equivalent in adolescents, active adults and pregnant women. *Nutrients*, 8, 438.
- MORALES, D. R. & MORRIS, A. D. 2015. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annual review of medicine*, 66, 17-29.
- MORRIS JR, S. M. 2016. Arginine metabolism revisited. *The Journal of nutrition*, 146, 2579S-2586S.

- MÜLLER, M. & GRAEVE, L. 2014. Proteine–Mechanismen ihres Abbaus. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer.
- MURAYAMA, A., OHMORI, K., FUJIMURA, A., MINAMI, H., YASUZAWA-TANAKA, K., KURODA, T., OIE, S., DAITOKU, H., OKUWAKI, M., NAGATA, K., FUKAMIZU, A., KIMURA, K., SHIMIZU, T. & YANAGISAWA, J. 2008. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell*, 133, 627-39.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL 1995. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition*, Washington, DC, USA, National Academies Press.
- NEJABATI, H. R., SAMADI, N., SHAHNAZI, V., MIHANFAR, A., FATTAHI, A., LATIFI, Z., BAHRAMI-ASL, Z., ROSHANGAR, L. & NOURI, M. 2020a. Nicotinamide and its metabolite N1-Methylnicotinamide alleviate endocrine and metabolic abnormalities in adipose and ovarian tissues in rat model of Polycystic Ovary Syndrome. *Chem Biol Interact*, 324, 109093.
- NEJABATI, H. R., SCHMEISSER, K., SHAHNAZI, V., SAMIMIFAR, D., FARIDVAND, Y., BAHRAMI-ASL, Z., FATHI-MAROUFI, N., NIKANFAR, S. & NOURI, M. 2020b. N1-Methylnicotinamide: An Anti-Ovarian Aging Hormetin? *Ageing Res Rev*, 62, 101131.
- NEMOTO, S., FERGUSSON, M. M. & FINKEL, T. 2004. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science*, 306, 2105-2108.
- NOLAN, T., HANDS, R. E. & BUSTIN, S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1, 1559-1582.
- NOVELLE, M. G., ALI, A., DIÉGUEZ, C., BERNIER, M. & DE CABO, R. 2016. Metformin: a hopeful promise in aging research. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6, a025932.
- NOVOTNY, J., BANDUROVA, V., STRNAD, H., CHOVANEC, M., HRADILOVA, M., SACHOVA, J., STEFFL, M., GRUSANOVIC, J., KODET, R., PACES, V., LACINA, L., JR, K. S., PLZAK, J., KOLAR, M. & VOMASTEK, T. 2020. Analysis of HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinomas and Paired Normal Mucosae Reveals Cyclin D1 Deregulation and Compensatory Effect of Cyclin D2. *Cancers (Basel)*, 12.
- OBERDOERFFER, P., MICHAN, S., MCVAY, M., MOSTOSLAVSKY, R., VANN, J., PARK, S.-K., HARTLERODE, A., STEGMULLER, J., HAFNER, A. & LOERCH, P. 2008. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell*, 135, 907-918.
- PARKIN, D. M. 2005. Cancer Incidence in Five Continents, Vols. I to VIII. *IARC Cancer Base*.
- POMMERRENIG, B., FEUSSNER, K., ZIERER, W., RABINOVYCH, V., KLEBL, F., FEUSSNER, I. & SAUER, N. 2011. Phloem-specific expression of Yang cycle genes and identification of novel Yang cycle enzymes in *Plantago* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23, 1904-1919.
- RAGIN, C., MODUGNO, F. & GOLLIN, S. 2007. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *Journal of dental research*, 86, 104-114.
- RAJMAN, L., CHWALEK, K. & SINCLAIR, D. A. 2018. Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab*, 27, 529-547.

- REED, J. C. 1999. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol*, 11, 68-75.
- ROBERTS, M. N., WALLACE, M. A., TOMILOV, A. A., ZHOU, Z., MARCOTTE, G. R., TRAN, D., PEREZ, G., GUTIERREZ-CASADO, E., KOIKE, S. & KNOTTS, T. A. 2017. A ketogenic diet extends longevity and healthspan in adult mice. *Cell metabolism*, 26, 539-546. e5.
- ROCCIO, M., BOS, J. & ZWARTKRUIS, F. 2006. Regulation of the small GTPase Rheb by amino acids. *Oncogene*, 25, 657-664.
- RÖHM, K.-H. 2014a. Funktioneller Aminosäurestoffwechsel. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer.
- RÖHM, K.-H. 2014b. Prinzipien von Aminosäurestoffwechsel und Stickstoffumsatz. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer.
- ROSBE, K. W., BRANN, T. W., HOLDEN, S. A., TEICHER, B. A. & FREI, E. 1989. Effect of lonidamine on the cytotoxicity of four alkylating agents in vitro. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 25, 32-36.
- RUBINSZTEIN, D. C., MARIÑO, G. & KROEMER, G. 2011. Autophagy and aging. *Cell*, 146, 682-695.
- SANDULACHE, V. C., OW, T. J., PICKERING, C. R., FREDERICK, M. J., ZHOU, G., FOKT, I., DAVIS-MALESEVICH, M., PRIEBE, W. & MYERS, J. N. 2011. Glucose, not glutamine, is the dominant energy source required for proliferation and survival of head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer*, 117, 2926-38.
- SAXTON, R. A. & SABATINI, D. M. 2017. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 168, 960-976.
- SCHMITZ, W., KODERER, C., EL-MESERY, M., GUBIK, S., SAMPERS, R., STRAUB, A., KÜBLER, A. C. & SEHER, A. 2021. Metabolic Fingerprinting of Murine L929 Fibroblasts as a Cell-Based Tumour Suppressor Model System for Methionine Restriction. *International journal of molecular sciences*, 22, 3039.
- SHAW, R. J., BARDEESY, N., MANNING, B. D., LOPEZ, L., KOSMATKA, M., DEPINHO, R. A. & CANTLEY, L. C. 2004. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer cell*, 6, 91-99.
- SHAW, R. J., LAMIA, K. A., VASQUEZ, D., KOO, S.-H., BARDEESY, N., DEPINHO, R. A., MONTMINY, M. & CANTLEY, L. C. 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*, 310, 1642-1647.
- SHESTOV, A. A., LIU, X., SER, Z., CLUNTUN, A. A., HUNG, Y. P., HUANG, L., KIM, D., LE, A., YELLEN, G. & ALBECK, J. G. 2014. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *elife*, 3, e03342.
- SIMABUCO, F. M., MORALE, M. G., PAVAN, I. C. B., MORELLI, A. P., SILVA, F. R. & TAMURA, R. E. 2018. p53 and metabolism: from mechanism to therapeutics. *Oncotarget*, 9, 23780-23823.
- SON, M. J., RYU, J.-S., KIM, J. Y., KWON, Y., CHUNG, K.-S., MUN, S. J. & CHO, Y. S. 2017. Upregulation of mitochondrial NAD<sup>+</sup> levels impairs the clonogenicity of SSEA1+ glioblastoma tumor-initiating cells. *Experimental & molecular medicine*, 49, e344-e344.



- SPEAKMAN, J. R. 2005. Body size, energy metabolism and lifespan. *Journal of Experimental Biology*, 208, 1717-1730.
- STAIGER, H., STEFAN, N., KELLERER, M. & HÄRING, H.-U. 2014. Insulin—das wichtigste anabole Hormon. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer.
- STEPHENNE, X., FORETZ, M., TALEUX, N., VAN DER ZON, G., SOKAL, E., HUE, L., VIOLLET, B. & GUIGAS, B. 2011. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia*, 54, 3101-3110.
- SUGIMURA, T., BIRNBAUM, S. M., WINITZ, M. & GREENSTEIN, J. P. 1959. Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. VIII. The forced feeding of diets each lacking in one essential amino acid. *Archives of biochemistry and biophysics*, 81, 448-455.
- TAHTOUH, R., WARDI, L., SARKIS, R., HACHEM, R., RAAD, I., EL ZEIN, N. & HILAL, G. 2019. Glucose restriction reverses the Warburg effect and modulates PKM2 and mTOR expression in breast cancer cell lines. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 65, 26-33.
- TAN, Y., ZAVALA, J., SR., HAN, Q., XU, M., SUN, X., TAN, X., TAN, X., MAGANA, R., GELLER, J. & HOFFMAN, R. M. 1997. Recombinant methioninase infusion reduces the biochemical endpoint of serum methionine with minimal toxicity in high-stage cancer patients. *Anticancer Res*, 17, 3857-60.
- TANNER, J. M. & RUTTER, J. 2016. You Are What You Eat... or Are You? *Developmental cell*, 36, 483-485.
- TYLER, J. K. & JOHNSON, J. E. 2018. The role of autophagy in the regulation of yeast life span. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1418, 31.
- VAN DER WAAL, I. 2009. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral oncology*, 45, 317-323.
- VANDER HEIDEN, M. G., CANTLEY, L. C. & THOMPSON, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*, 324, 1029-1033.
- VITALE-CROSS, L., MOLINOLO, A. A., MARTIN, D., YOUNIS, R. H., MARUYAMA, T., PATEL, V., CHEN, W., SCHNEIDER, A. & GUTKIND, J. S. 2012. Metformin prevents the development of oral squamous cell carcinomas from carcinogen-induced premalignant lesions. *Cancer prevention research*, 5, 562-573.
- VOUSDEN, K. H. & RYAN, K. M. 2009. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer*, 9, 691-700.
- WANG, Y. S., DU, L., LIANG, X., MENG, P., BI, L., WANG, Y. L., WANG, C. & TANG, B. 2019. Sirtuin 4 Depletion Promotes Hepatocellular Carcinoma Tumorigenesis Through Regulating Adenosine-Monophosphate-Activated Protein Kinase Alpha/Mammalian Target of Rapamycin Axis in Mice. *Hepatology*, 69, 1614-1631.
- WARBURG, O., POSENER, K. & NEGELEIN, E. 1924. Über den stoffwechsel der carcinomzelle. *Naturwissenschaften*, 12, 1131-1137.
- WARNAKULASURIYA, S. 2009. Causes of oral cancer—an appraisal of controversies. *British dental journal*, 207, 471-475.
- WEI, M., BRANDHORST, S., SHELEHCHI, M., MIRZAEI, H., CHENG, C. W., BUDNIAK, J., GROSHEN, S., MACK, W. J., GUEN, E. & DI BIASE, S. 2017. Fasting-mimicking diet

- and markers/risk factors for aging, diabetes, cancer, and cardiovascular disease. *Science translational medicine*, 9.
- WEICHHART, T. 2018. mTOR as regulator of lifespan, aging, and cellular senescence: a mini-review. *Gerontology*, 64, 127-134.
- WOJTASZEWSKI, J. F., JØRGENSEN, S. B., HELLSTEN, Y., HARDIE, D. G. & RICHTER, E. A. 2002. Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in ratskeletal muscle. *Diabetes*, 51, 284-292.
- WU, X., YEERNA, H., GOTO, Y., ANDO, T., WU, V. H., ZHANG, X., WANG, Z., AMORNPHIMOLTHAM, P., MURPHY, A. N., TAMAYO, P., CHEN, Q., LIPPMAN, S. M. & GUTKIND, J. S. 2019. Metformin Inhibits Progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Acting Directly on Carcinoma-Initiating Cells. *Cancer Res*, 79, 4360-4370.
- YAMADA, M., TOMIDA, A., YUN, J., CAI, B., YOSHIKAWA, H., TAKETANI, Y. & TSURUO, T. 1999. Cellular sensitization to cisplatin and carboplatin with decreased removal of platinum-DNA adduct by glucose-regulated stress. *Cancer Chemother Pharmacol*, 44, 59-64.
- YE, Y.-C., YU, L., WANG, H.-J., TASHIRO, S.-I., ONODERA, S. & IKEJIMA, T. 2011. TNF $\alpha$ -induced necroptosis and autophagy via supression of the p38–NF- $\kappa$ B survival pathway in L929 cells. *Journal of pharmacological sciences*, 1110240613-1110240613.
- ZHANG, H., KONG, Q., WANG, J., JIANG, Y. & HUA, H. 2020a. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol*, 9, 32.
- ZHANG, J., CHEN, Y., LIU, C., LI, L. & LI, P. 2020b. N(1)-Methylnicotinamide Improves Hepatic Insulin Sensitivity via Activation of SIRT1 and Inhibition of FOXO1 Acetylation. *J Diabetes Res*, 2020, 1080152.
- ZHANG, N. & SAUVE, A. A. 2018. Regulatory effects of NAD<sup>+</sup> metabolic pathways on sirtuin activity. *Progress in molecular biology and translational science*, 154, 71-104.
- ZHOU, Y., REN, J., SONG, T., PENG, J. & WEI, H. 2016. Methionine regulates mTORC1 via the T1R1/T1R3-PLC $\beta$ -Ca<sup>2+</sup>-ERK1/2 signal transduction process in C2C12 cells. *International journal of molecular sciences*, 17, 1684.
- ZUR HAUSEN, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews cancer*, 2, 342-350.

Appendix

I. Gesamtübersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen

Average rel. Lamivudine-Norm. Peak Area[%]

rot: viel (bis 100%)  
blau: wenig (ab 10%)

Cells: Highest metabolite conc. of all samples (of the same VS) correspond to 100%

Average rel. Lamivudine-Norm. Peak Area[%]

rot: mehr als Blank-Medium  
blau: weniger als Blank-Medium

Media: Metabolite conc. in blank full media corresponds to 100%

Table with columns: Class, Compound, Cells in Full Medium (d1-d5), Cells in Met-Medium (d1-d5). Rows include categories like Stds., Non-ess. Prot. Amino Acids, Ess. Prot. Amino Acids, YangCycle, '5'-Metab., Trp-Metabs, Gly Metab., BCAA Deriv., AA Deriv., Glycolysis, PPW, and Carbohydrates.

Table with columns: Class, Compound, Full Medium (d1-d5), Met-Medium (d1-d5). Rows include categories like Stds., Non-ess. Prot. Amino Acids, Ess. Prot. Amino Acids, YangCycle, '5'-Metab., Trp-Metabs, Gly Metab., BCAA Deriv., AA Deriv., Glycolysis, PPW, and Carbohydrates.



## II. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
ADP	Adenosindiphosphat
Act- $\beta$	Aktin-beta
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cisplatin	Cis-Diamindichlorplatin (II)
CRM	Kalorien-Restriktions-Mimetika
Ct	Cycle Treshold (Schwellenwertzyklus)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FBS/FCS	Fetal bovine serum/ Fetal calf serum
FGF-21	Fibroblast growth factor 21
Fructose-1,6-P2	Fructose-1,6-bisphosphonat
GDP	Guanosindiphosphat
GHR	Growth hormone receptor
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosintriphosphat
HEM	High-Energy-Metabolismus
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillomvirus
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
LC/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie
LEM	Low-Energy-Metabolismus

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
LKB1	Liver kinase B1
Map1lc3B	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
Met	Methionin
MetR	Methionin-Restriktion
mNAM	N1-Methylnicotinamid
MTA	5'-Methylthioadenosin
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MW	Mittelwert
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NAM	Nicotinamid
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NMN	Nicotinamid Mononukleotid
p53	Tumorsupressor p53
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PET/CT	Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomografie
PKA	cAMP abhängige Proteinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT-PCR	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
RZ	Relative Zellzahl
SAM	S-Adenosylmethionin
SIRT1	Sirtuin 1
STABW	Standardabweichung
TE-Puffer	Tris/EDTA - Puffer
TNM (Präfix: „p“)	Primärtumor, Lymphknotenbefall, Fernmetastasen (Präfix: „histologisch“)
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
ZytoTox	Zytotoxizitätsassay

### III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Regulation des Energiehaushaltes einer Zelle im Überblick (modifiziert nach (Gillespie et al., 2016)).....	6
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Low-/ bzw. High-Energy-Metabolismus (modifiziert nach (Koderer, 2021)) .....	11
Abb. 3 A + B: Energiegewinnung differenzierter Zellen im Vergleich zu proliferativen-/Tumorzellen.....	12
Abb. 4: Einfluss der Kalorien-Restriktion auf eukaryotische Zellen und Organismen (modifiziert nach (Escobar et al., 2019)) .....	17
Abb. 5: schematische Darstellung einer log <sub>2</sub> -Verdünnungsreihe mit Metformin und NAD <sup>+</sup> .....	34
Abb. 6: Schematische Darstellung der log <sub>2</sub> -Verdünnungsreihen der Zelllinien HeLa und L929 mit D-Glukose, Cisplatin, TNF und Fas-Ligand.....	34
Abb. 7: Typisches Pipettierschema einer RT-PCR.....	37
Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für die massenspektrometrische Untersuchung. ....	39
Abb. 9: A-D Proliferationsverhalten der Zelllinien L929 und HeLa nach Glukose-Restriktion.....	46
Abb. 10: Mikroskopische Analyse der Zellen unter Glukose-Restriktion (40-fache Vergrößerung). ....	48
Abb. 11: Proliferationsverhalten der Zelllinien HeLa und L929 unter Normalbedingungen und Glukose-Restriktion in Kombination mit den Faktoren Cisplatin, FasL und TNF $\alpha$ .....	52
Abb. 12: A-G Proliferationsverhalten der Zelllinien HeLa, HaCaT, Detroit562, FaDu, SCC9, SCC25 und L929 unter Metformin.....	54
Abb. 13: A-G Proliferationsverhalten der Zelllinien HeLa, HaCaT, Detroit562, FaDu, SCC9, SCC25 und L929 unter NAD <sup>+</sup> .....	56
Abb. 14: Darstellung des Proliferationsverhaltens der Zelllinie HeLa unter Vollmedium und MetR der für die Massenspektrometrie durchgeführten Versuche	62
Abb. 15 A und B – Übersicht einzelner Stoffwechselgruppen der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen .....	64
Abb. 16 A und B: Heat-Map Darstellung der proteinogenen Aminosäuren. ....	66
Abb. 17: Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – nicht proteinogene Aminosäuren und Aminosäurederivate des Harnstoffzyklus.....	67
Abb. 18: Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – direkte Met/Cystein abhängige Metaboliten .....	68
Abb. 19: Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – „indirekt Met/Cystein abhängige Metaboliten“ .....	70
Abb. 20: Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – Energiewährung .....	71
Abb. 21: Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – Metaboliten der Glykolyse.....	72

<b>Abb. 22: Metaboler Fingerabdruck der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen nach 72 h.....</b>	<b>74</b>
<b>Abb. 23: A und B. A) Metabolismus der Zelllinie L929 unter MetR und proliferativen Bedingungen-Darstellung von C. Koderer B) Metabolismus der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – Eigene Darstellung. ....</b>	<b>75</b>
<b>Abb. 24 A und B: A „Footprint“ der Zelllinie L929 unter MetR und proliferativen Bedingungen-(Schmitz et al., 2021) B Vergleich der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen – Eigene Zahlenwerte. ....</b>	<b>77</b>
<b>Abb. 25: „Footprint“ der Zelllinie HeLa unter MetR und proliferativen Bedingungen</b>	<b>78</b>
<b>Abb. 26: Arbeitsprogramm – vereinfachte schematische Übersicht.....</b>	<b>80</b>

#### **IV. Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1: Verwendete Zelllinien .....</b>	<b>27</b>
<b>Tab. 2: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze .....</b>	<b>28</b>
<b>Tab. 3: Übersicht über die Konzentrationen selbst angemischter Medien .....</b>	<b>28</b>
<b>Tab. 4: Reagenzien und Chemikalien.....</b>	<b>28</b>
<b>Tab. 5: Verwendete Geräte .....</b>	<b>29</b>
<b>Tab. 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>30</b>
<b>Tab. 7: Verwendete Lösungen und Puffer .....</b>	<b>30</b>
<b>Tab. 8: Verwendete Kits und Assays.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabelle 9: Primer-Liste des QuantiTect® Primer Assays .....</b>	<b>31</b>
<b>Tab. 10: Split-Verhältnisse .....</b>	<b>32</b>
<b>Tab. 11: Übersicht der in der Massenspektrometrie untersuchten Metaboliten.....</b>	<b>42</b>
<b>Tab. 12: PCR-Ergebnisse der Analyse der Faktoren FGF-21, IGF-1, MAP1lc3B du p53</b>	<b>59</b>



## V. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die mich im Verlauf dieser Dissertation unterstützt haben, danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg für die Themenanregung, das zur Verfügung stellen des wissenschaftlichen Labors sowie für die Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Axel Seher, dem Leiter des wissenschaftlichen Labors der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg für die tolle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation. Danke für das intensive Korrekturlesen meiner Arbeit, den kritischen, intellektuellen Austausch und die Hilfestellungen und Ideen im Labor, ohne die so manches Experiment sicherlich weniger reibungslos verlaufen wäre.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. Thomas Müller für die Übernahme des Zweitgutachtens und bei Herrn Dr. Werner Schmitz für die gute Zusammenarbeit bei der Auswertung der massenspektrometrischen Analyse am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Würzburg.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des wissenschaftlichen Labors - insbesondere bei Frau Margit Schleyer - und Doktoranden bedanken, die diese Zeit zu einer tollen Erfahrung mit herzlichen Begegnungen und Hilfsbereitschaft werden ließen, die ich in sehr guter Erinnerung behalten werde.

Von ganzem Herzen möchte ich mich auch bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Ich kann mich unendlich glücklich schätzen, solch ein liebevolles Umfeld um mich herum zu haben. Vor allem meinen Eltern, Janna und Bernd Frackmann möchte ich danken, die mich besonders während der Zeit dieser Dissertation seelisch und moralisch unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Ängste hatten. Danke, dass ihr immer für mich da seid und ich mich in jeder Lebenssituation bedingungslos auf euch verlassen kann.



## VII. Publikationen

### **Wissenschaftliche Publikation mit Beiträgen dieser Arbeit:**

Schmitz, W; Ries, E; Koderer, C; Völter, M. F.; Wunsch, A. C.; El-Mesery, M.; **Frackmann, K.**; Kübler, A. C.; Linz, C.; Seher, A.

Cysteine Restriction in Murine L929 Fibroblasts as an Alternative Strategy to Methionine Restriction in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(21), 11630. <https://doi.org/10.3390/ijms222111630>

### **VIII. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „*In Vitro* Analyse der Glukose- und Methionin-Restriktion im humanen Modellsystem HeLa sowie im Plattenepithelkarzinom HNSCC“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher bei keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form eingereicht. Ich habe bis zum heutigen Tag keine akademischen Grade erworben, noch versucht solche zu erwerben.

Es wurde mir kein akademischer Grad entzogen, noch wurde gegen mich diesbezüglich ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.

München, den 10.08.2022





