

**Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Achim Wöckel**

**Effekt von  $\beta$ -Hydroxybutyrat und Acetoacetat  
auf die Proliferationsaktivität  
und die Strahlensensibilität  
von Kolonkarzinomzellen  
mit unterschiedlichem  
p53-Status**

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

vorgelegt von

**Alexander Kurt Kristen**

aus Würzburg

Würzburg, November 2022

**Referentin:** Prof. Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer

**Korreferent/Korreferentin:** Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 01.09.2023

**Der Promovend ist Arzt**

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung .....</b>                               | <b>1</b>  |
| 1.1      | Kolorektales Karzinom.....                            | 2         |
| 1.1.1    | Epidemiologie.....                                    | 2         |
| 1.1.2    | Ätiologie und Karzinogenese .....                     | 2         |
| 1.1.3    | Konventionelle Therapie .....                         | 5         |
| 1.2      | Die ketogene Diät .....                               | 6         |
| 1.2.1    | Therapeutisches Spektrum der ketogenen Diät.....      | 7         |
| 1.3      | Ketonkörperstoffwechsel .....                         | 8         |
| 1.3.1    | Ketonkörpersynthese .....                             | 8         |
| 1.3.2    | Verwertung der Ketonkörper .....                      | 10        |
| 1.3.3    | Monocarboxylat-Transporter .....                      | 11        |
| 1.3.4    | G-Protein gekoppelte Rezeptoren 41, 43 und 109A ..... | 12        |
| 1.3.4.1  | GPR41 und GPR43 .....                                 | 12        |
| 1.3.4.2  | GPR109A.....  | 13        |
| 1.4      | Tumorsuppressor p53.....                              | 14        |
| 1.5      | p21.....  | 16        |
| 1.6      | p27.....  | 17        |
| 1.7      | Zielsetzung .....                                     | 18        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden.....</b>                     | <b>19</b> |
| 2.1      | Material .....  | 19        |
| 2.1.1    | Zelllinien .....                                      | 19        |
| 2.1.1.1  | Humane Kolonkarzinomzelllinien.....                   | 19        |
| 2.1.1.2  | Sonstige verwendete Zelllinien .....                  | 20        |
| 2.1.2    | Geräte und Verbrauchsutensilien.....                  | 20        |
| 2.1.3    | Chemikalien und Reagenzien .....                      | 24        |
| 2.1.4    | Antikörper .....                                      | 27        |
| 2.1.5    | Primer.....   | 28        |
| 2.1.6    | Bausätze (Kits).....                                  | 29        |
| 2.1.7    | Gele.....   | 30        |
| 2.1.8    | Computer-Software .....                               | 30        |
| 2.2      | Methoden.....   | 31        |
| 2.2.1    | Arbeitsbedingungen .....                              | 31        |
| 2.2.1.1  | Arbeit an Zellkulturen.....                           | 31        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.1.2 Arbeit unter hypoxischen Bedingungen .....                               | 31        |
| 2.2.1.3 Arbeit zur Isolierung von RNA (Ribonukleinsäure) .....                   | 31        |
| 2.2.2 Herstellung der verwendeten Medien .....                                   | 31        |
| 2.2.2.1 Anzuchtmedium .....  | 31        |
| 2.2.2.2 G5-Medium .....  | 32        |
| 2.2.3 Methoden der Zellkultur .....  | 32        |
| 2.2.3.1 Zellen aus der Kryokonservierung auftauen/ Neue Zellkultur anlegen ..... | 32        |
| 2.2.3.2 Trypsinbehandlung der Zellen .....                                       | 32        |
| 2.2.3.3 Kryokonservierung .....  | 33        |
| 2.2.3.4 Zellzahlbestimmung .....   | 33        |
| 2.2.3.5 Herstellung einer Verdünnungsreihe .....                                 | 33        |
| 2.2.3.6 Behandlung von Zellkulturen durch Zusatz von Lösungen .....              | 34        |
| 2.2.3.7 Zellpelletierung für PCR oder Western Blot .....                         | 35        |
| 2.2.3.8 Strahlenbehandlung von Zellkulturen .....                                | 35        |
| 2.2.4 Methoden der Zellvitalitätsassays .....                                    | 35        |
| 2.2.4.1 WST-8 Test .....   | 35        |
| 2.2.4.2 Kristallviolett-Test .....   | 36        |
| 2.2.4.3 Colony-Forming-Assay .....   | 36        |
| 2.2.5 Genexpressionsanalyse .....  | 37        |
| 2.2.5.1 RNA-Extraktion .....   | 37        |
| 2.2.5.2 Quantifizierung der RNA .....  | 37        |
| 2.2.5.3 cDNA-Synthese bzw. Reverse-Transkriptions-Reaktion .....                 | 37        |
| 2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion .....  | 37        |
| 2.2.5.5 Gelelektrophorese .....  | 40        |
| 2.2.6 Proteinexpressionsanalyse .....  | 41        |
| 2.2.6.1 Pufferlösungen .....   | 41        |
| 2.2.6.2 Lyse der Zellpellets .....   | 41        |
| 2.2.6.3 Bestimmung der Proteinmenge .....  | 42        |
| 2.2.6.4 Bestimmung der Lademenge .....   | 42        |
| 2.2.6.5 Denaturierung .....  | 42        |
| 2.2.6.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....    | 42        |
| 2.2.6.7 Blotting .....   | 43        |
| 2.2.6.8 Antikörperbehandlung .....   | 43        |
| 2.2.6.9 Filmentwicklung .....  | 44        |
| 2.2.7 Statistische Auswertung .....  | 44        |
| <b>3 Ergebnisse .....</b>  | <b>45</b> |
| 3.1 Proteinexpressionsanalysen .....   | 45        |
| 3.1.1 p53 .....  | 45        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.1.2    | p21 und p27 .....  | 46        |
| 3.2      | Genexpressionsanalysen .....   | 47        |
| 3.2.1    | GPR41, GPR43 und GPR109A .....   | 48        |
| 3.2.2    | MCT-1 und MCT-4 .....  | 49        |
| 3.3      | Einfluss von Lithium auf die Zellproliferation .....   | 50        |
| 3.3.1    | Zellvitalitätssays mit LiCl .....  | 50        |
| 3.3.1.1  | WST-8 Test.....  | 50        |
| 3.3.1.2  | Kristallviolett-Test.....  | 51        |
| 3.3.2    | Zellvitalitätsassays mit Natriumacetoacetat (NaAcAc).....  | 52        |
| 3.4      | Einfluss der Ketonkörper auf die Zellproliferation .....   | 53        |
| 3.4.1    | WST-8-Test.....  | 54        |
| 3.4.2    | Kristallviolett-Test.....  | 55        |
| 3.5      | Strahlensensibilität der Zelllinien .....  | 56        |
| 3.5.1    | Bestrahlungskurven .....   | 56        |
| 3.5.1.1  | WST-8-Test.....  | 57        |
| 3.5.1.2  | Kristallviolett-Test.....  | 58        |
| 3.5.2    | Strahlendosis von 2 Gy .....   | 59        |
| 3.5.2.1  | WST-8-Test.....  | 60        |
| 3.5.2.2  | Kristallviolett-Test.....  | 61        |
| 3.6      | Colony-Forming-Assay (Koloniebildungs-Test) .....  | 62        |
| 3.6.1    | Koloniebildung unter normoxischen Bedingungen .....  | 62        |
| 3.6.2    | Wirkung ionisierender Strahlung auf die Koloniebildung.....  | 64        |
| 3.6.3    | Einfluss der Ketonkörper auf die Koloniebildung bei 2 Gy .....   | 65        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>68</b> |
| 4.1      | Bedeutung der Hypoxie für die durchgeführten Versuche.....   | 68        |
| 4.2      | Proteinexpressionsanalysen.....  | 68        |
| 4.2.1    | Expression von p53.....  | 68        |
| 4.2.2    | Expression von p21.....  | 69        |
| 4.2.3    | Expression von p27 .....   | 69        |
| 4.2.4    | Ladekontrolle mit Lamin B1.....  | 70        |
| 4.3      | Genexpressionsanalysen .....   | 70        |
| 4.3.1    | Expression von MCT-1 und MCT-4.....  | 70        |
| 4.3.2    | Expression von GPR41, -43 und 109A .....   | 71        |
| 4.4      | Wirkung von Lithium innerhalb des Lithiumsalzes LiAcAc auf die Proliferation der<br>Kolonkarzinomzellen..... | 71        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.5      | Wirkung von 3-OHB und AcAc auf die Kurzzeit-Proliferation der<br>Kolonkarzinomzellen.....                    | 72        |
| 4.6      | Wirkung ionisierender Strahlung auf die Kurzzeit- und Langzeit-Proliferation der<br>Kolonkarzinomzellen..... | 72        |
| 4.7      | Wirkung von 3-OHB und AcAc auf die Strahlensensibilität der Zellen bei einer<br>Strahlendosis von 2 Gy.....  | 74        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>76</b> |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>77</b> |

# 1 Einleitung

Die vorliegende experimentelle Arbeit untersucht den Einfluss der physiologischen Ketonkörper  $\beta$ -Hydroxybutyrat (3-OHB) und Acetoacetat (AcAc) auf Kolonkarzinomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status.

## 1.1 Kolorektales Karzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

In den höher entwickelten Staaten belegen die Karzinome des Kolons und des Rektums Platz zwei und drei der häufigsten Tumorneuerkrankungen bei Männern bzw. Frauen (Torre et al., 2015).

Für 2022 wird die altersstandardisierte Neuerkrankungsrate je 100.000 Personen an Darmkrebs in Deutschland auf 48,6 bei Männern bzw. 30,3 bei Frauen geschätzt. Im Vergleich mit 2017 (51,5 und 33,6) und 2018 (52,1 und 32,7) zeigt sich die standardisierte Neuerkrankungsrate weiterhin sinkend (Robert-Koch-Institut, 2021). Dieser Trend sowie die abfallende standardisierte Sterberate werden in Abbildung 1 (Abb.1) veranschaulicht. Ein langfristiger Inzidenzrückgang sei durch die Vorsorgekoloskopie, welche 2002 dem gesetzlichen Krebsfrüherkennungsprogramm hinzugefügt wurde, zu erwarten. Durch Diagnose früherer Krebsstadien und Entdeckung von Vorstufen konnte von 2003-2012 bereits ein deutlicher Rückgang der altersstandardisierten Inzidenz festgestellt werden (Brenner et al., 2016).

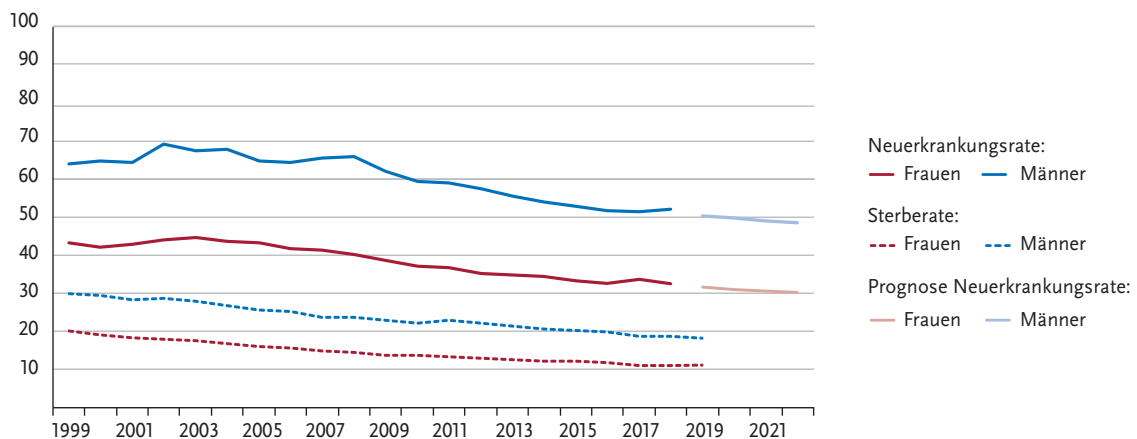


Abb. 1 - Geschlechterspezifische Neuerkrankungs- und Sterberate von Darmkrebs pro 100 000 Einwohner in Deutschland von 1999 bis 2018/2019, Prognose bis 2022 (altersstandardisiert). ICD-10 C18-C20. C18: Bösartige Neubildung des Kolons; C19: Bösartige Neubildung am Rektosigmoid, Übergang, C20: Bösartige Neubildung des Rektums. Bild aus der Veröffentlichung „Krebs in Deutschland für 2017/2018“ des Robert-Koch-Instituts (Robert-Koch-Institut, 2021). Gedruckt mit Erlaubnis des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert-Koch-Institut.

### 1.1.2 Ätiologie und Karzinogenese

Es ist wissenschaftlich anerkannt, dass sich die meisten aller kolorektalen Karzinome innerhalb der sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz entwickeln. Über schrittweise



genetische Veränderungen kommt es zur Umwandlung des normalen Epithels über benigne Vorstufen (Adenome) bis hin zum Karzinom (siehe (s.) Abb. 2). Folglich finden sich in Adenomen üblicherweise weniger genetische Veränderungen als in Karzinomen. Allerdings geht nur ein sehr geringer Teil aller Adenome in ein Karzinom über (Day & Morson, 1978; Fearon & Vogelstein, 1990; Leslie et al., 2002).

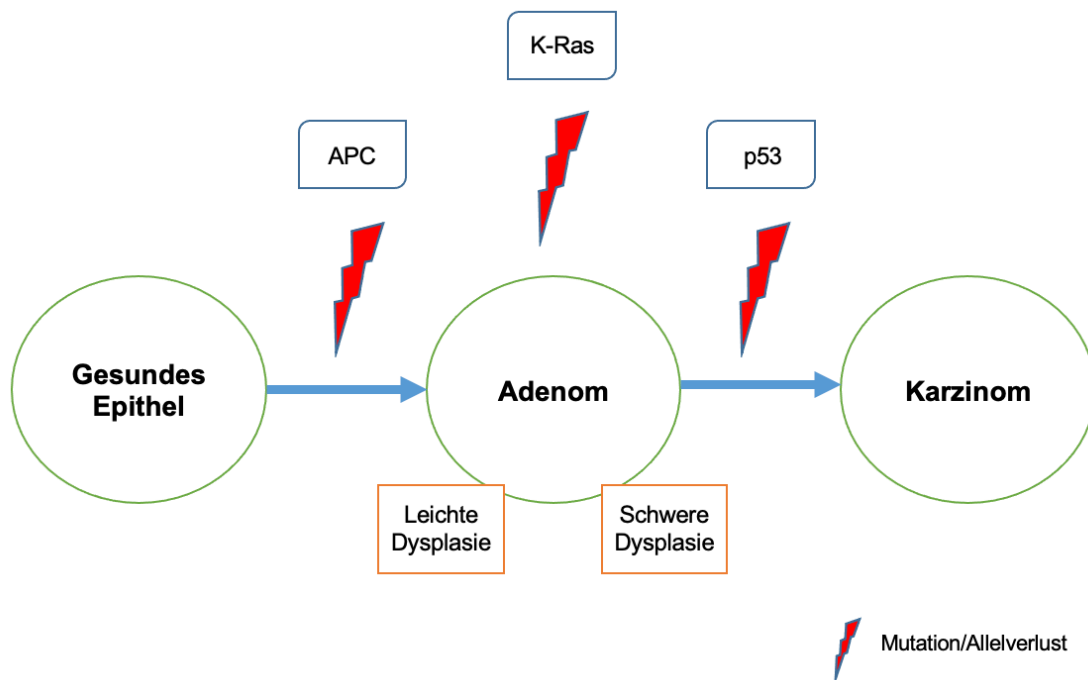


Abb. 2 - Adenom-Karzinom-Sequenz (vereinfachte Darstellung). Der Großteil aller kolorektalen Karzinomen geht aus Adenomen als dysplastische Vorläufer hervor. Verursacht werden die dysplastischen Veränderungen durch Genmutationen, welche typischerweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftreten. Als erste genetische Veränderung tritt meist eine Mutation des APC-Tumorsuppressorgens auf, was in einer dysplastischen Veränderung des Epithels resultiert. Mutationen im K-Ras Protoonkogen sind meist innerhalb des Adenomstadiums zu verzeichnen. Ein Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 findet typischerweise erst später im Verlauf statt und begünstigt letztendlich den Übergang zum kolorektalen Karzinom (Arastéh et al., 2018; Fearon & Vogelstein, 1990; Herold, 2019; Terzic et al., 2010).

Der Großteil aller Kolonkarzinome tritt sporadisch auf. Etwa 30 % aller Karzinome zeigen eine familiäre Häufung im Sinne einer Erberkrankung. Darunter fallen auch die gut beschriebenen autosomal-dominanten Erkrankungen familiäre adenomatöse polyposis coli (FAP) und das Lynch-Syndrom. Verantwortlich für das Lynch-Syndrom sind Mutationen in DNA-Mismatch-Reparaturgenen (MMR-Gene) (Jasperson et al., 2010). Die MMR-Gene, die am häufigsten betroffen sind, sind hierbei MLH1 (MutL Homolog 1)

(50 %), MSH2 (MutS Homolog 2) (39 %) und MSH6 (MutS Homolog 6) (7 %) (Peltomäki & Vasen, 2004). Bei FAP hingegen sorgen Mutationen im APC-Gen (Adenomatöses Polyposis Coli Gen), welches für ein Tumorsuppressorprotein codiert, für die Ausprägung des Krankheitsbildes (Jasperson et al., 2010).

Das Kolonkarzinom ist ein Karzinom multifaktorieller Genese (S. K. H. Li & Martin, 2016). Neben genetischer Prädisposition beeinflussen unter anderem Fettleibigkeit, Nikotinkonsum, Alter, chronische Inflamationsprozesse, Vorerkrankungen (besonders chronisch entzündliche Darmerkrankungen) und Essgewohnheiten das Risiko der Ausbildung eines Kolonkarzinoms (Labianca et al., 2013; S. K. H. Li & Martin, 2016). Während die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) beispielsweise den Konsum von verarbeitetem Fleisch als krebserregend und den Verzehr von rotem Fleisch als möglicherweise krebserregend einstuft (IARC, 2018), sind andere Essgewohnheiten und Nahrungsbestandteile mit einem geringen Risiko an Darmkrebs zu erkranken assoziiert (Magalhães et al., 2012). Die ausreichende Zufuhr von Ballaststoffen beispielsweise sei durch ihren direkten Einfluss auf das im Darm ansässige Mikrobiom mit einem geringeren Risiko assoziiert. Durch die bakterielle Fermentation unverdaulicher Ballaststoffe entstehen die kurzkettigen Fettsäuren (SCFA = short chain fatty acid) Butyrat, Propionat und Acetat (O'Keefe, 2016). Roediger beschreibt bereits 1982 im Versuch mit tierischen Zellen die Bedeutung der SCFAs als Hauptenergiequelle für das Kolonepithel (Roediger, 1982). Darüber hinaus scheinen die SCFAs über eine Inaktivierung der Histon-Deacetylasen eine antiproliferative und antiinflammatorische Wirkung zu besitzen (Waldecker et al., 2008).

Ein Zusammenhang zwischen Entzündung und kolorektalen Karzinomen ist bereits beschrieben. Besonders die Situation einer chronischen Inflammation, wie sie beispielsweise bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CEDs) zu beobachten ist, begünstigt über proinflammatorische Mediatoren sowohl Wachstum und Progression als auch Invasion und Metastasierung der Karzinome (Janakiram & Rao, 2014). Dauerhaft erhöhte Zytokinlevel können Mutationen von Tumorsuppressorgenen (z.B. p53 und APC) und Onkogenen (z.B. KRAS) und somit die Tumorentwicklung begünstigen (Terzic et al., 2010). Auch Adipositas ist über eine vermehrte Infiltration inflammatorischer Zellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten) und eine damit verbundene gesteigerte Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNFalpha) mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert (Pietrzyk et al., 2015; Tarasiuk et al., 2018). Eine klinische Studie aus dem Jahr 2008 zeigt eine positive Korrelation zwischen Körpergewicht und IL-6-Serumkonzentration (Peairs & Rankin, 2008). Fettleibigkeit kann

folglich auch als Auslöser chronischer Inflammation angesehen werden (Tzanavari et al., 2010). Neben der vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine spielen veränderte Hormonspiegel bei der Adipositas assoziierten Krebsentstehung eine entscheidende Rolle. Bei Fettleibigkeit können erhöhte IGF-1-(Insulin-like growth factor 1) und Insulinwerte beobachtet werden (Tarasiuk et al., 2018). Außerdem kommt es zu einem veränderten Gleichgewicht der Adipokine. Während die Adiponektinspiegel bei Adipositas erniedrigt sind, sind die Leptinspiegel deutlich erhöht (Molina et al., 2003; Pietrzyk et al., 2015). Genannte Veränderungen führen zusammengefasst zu einer verstärkten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs, wodurch Zellwachstum und -überleben unterstützt und folglich die Karzinogenese begünstigt wird (Garcia-Echeverria & Sellers, 2008; X. F. Huang & Chen, 2009). Adiponektin, welches bei Adipositas vermindert ist, wirkt normalerweise antiinflammatorisch, indem es unter anderem die Expression von TNFalpha reduziert (H. Huang et al., 2008). TNFalpha und IL-6 reduzieren in einem umgekehrten Mechanismus die Ausschüttung von Adiponektin (He et al., 2016; Simons et al., 2007).

Eine retrospektive Kohortenstudie aus dem Jahr 2008 suggeriert den Zusammenhang zwischen Gewichtsreduktion und Senkung des Risikos der Entwicklung eines kolorektalen Adenoms, der Vorstufe des kolorektalen Karzinoms. Hieraus lässt sich ableiten, dass das Risiko der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms vermeintlich durch Gewichtsreduktion gesenkt werden kann (Yamaji et al., 2008).

### **1.1.3 Konventionelle Therapie**

Therapie der ersten Wahl ist die operative Exzision. Anschließend erfolgt beim Kolonkarzinom und Rektumkarzinom des oberen Drittels meist eine adjuvante Chemotherapie mit Fluorpyrimidinen (Capecitabin oder 5-Fluoruracil) und Oxaliplatin in Kombination, welche in der Regel ab UICC Stadium III durchgeführt wird. Im FOLFOX Schema wird 5-FU (5-Fluoruracil) mit Folinat und Oxaliplatin kombiniert, im XELOX Schema Capecitabin und Oxaliplatin. Bei Rektumkarzinomen des mittleren und unteren Drittels kommt ab Stadium II eine neoadjuvante Radio- bzw. Radiochemotherapie zum Einsatz (Herold, 2019).

Obwohl eine adjuvante Mono-Chemotherapie mit Fluorpyrimidinen auch häufig im UICC (Union for International Cancer Control) Stadium II Anwendung findet, ist es noch weitgehend unklar, ob sich die Therapie im vorliegenden Stadium tatsächlich positiv auf das krankheitsspezifische Überleben auswirkt (Dienstmann et al., 2015). In diesen Fällen ist eine Einschätzung der jeweils vorliegenden Risikofaktoren durch das ärztliche

Fachpersonal gefragt. Risikofaktoren, die hierbei in Betracht gezogen werden, sind eine starke lokale Ausbreitung (Stadium pT4), ein geringer Differenzierungsgrad des Tumors, die Biopsie von weniger als 12 Lymphknoten beim Staging, das Vorliegen einer Obstruktion oder Perforation und die vaskuläre oder lymphatische Invasion (Labianca et al., 2013).

Zielgerichtete Therapieoptionen finden bislang noch kaum Anwendung in der adjuvanten kurativen Behandlung des Kolonkarzinoms. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2017 kam zu dem Ergebnis, dass weder die Gabe von Cetuximab noch Bevacizumab zusätzlich zur adjuvanten Chemotherapie mit Fluorpyrimidinen einen positiven Therapienutzen generiere (B. J. Kim et al., 2017).

## 1.2 Die ketogene Diät

Die Erkenntnis, dass die Aufnahme von Kohlenhydraten nicht lebenswichtig ist und der Körper alternative Quellen zur Energiegewinnung nutzen kann, stellt die Grundlage für das Prinzip der ketogenen Diät dar (Gershuni et al., 2018). Die ketogene Diät ist durch eine reichhaltige Zufuhr von Fetten und eine sehr restriktive Zufuhr von Kohlenhydraten (low carb, high fat) gekennzeichnet. Etwa 80 % der Kalorien werden in Form von Fetten zugeführt, wobei die tägliche Proteinmenge etwa 1 g/kg betragen sollte (J. M. Freeman & Kossoff, 2010). Durch diese Art der Ernährung wird ein Fastenzustand simuliert, die Lipolyse und folglich die Ketonkörpersynthese angeregt (Hohn et al., 2019). Ziel der Diät ist das Erreichen und dauerhafte Verweilen im Zustand der sogenannten physiologischen Ketose. Um dies zu ermöglichen, sollte die zugeführte Menge an Kohlenhydraten weniger als 50 Gramm pro Tag betragen (Westman, 2002). Außerdem kann der ketogene Quotient beachtet werden, welcher sich aus dem Verhältnis der zugeführten Menge an Fetten geteilt durch die Menge an Kohlenhydraten und Eiweißen errechnet (Wirrell, 2008; Zilberter & Zilberter, 2018). Die menschliche Leistungsfähigkeit kann unter ketogener Diät trotz einem beinahe kompletten Ausschluss von Kohlenhydraten aufrechterhalten werden (Phinney, 2004). Durch die vermehrte Aufnahme mittelkettiger statt langkettiger Fettsäuren (LCTs) kann die ketogene Diät noch effektiver gestaltet werden, da die mittelkettigen Fettsäuren besser in die Leber aufgenommen werden und dort einen größeren Anteil zur Ketonkörpersynthese beitragen (Walczyk & Wick, 2017). Im Vergleich zu einer LCT basierten Diät werden bei einer Diät, die auf der Aufnahme mittelkettiger Fettsäuren basiert, mehr Ketonkörper pro Kalorie synthetisiert (Hartman et al., 2007). Der Begriff der „physiologischen Ketose“

wurde erstmalig von Hans Adolf Krebs verwendet (Krebs, 1966). Die physiologische Ketose darf jedoch nicht mit der diabetischen Ketoazidose verwechselt werden. Während der ketogenen Diät erreicht  $\beta$ -Hydroxybutyrat (3-OHB) im Blut eine Konzentration von etwa 2-5 mmol/l (Cahill & Veech, 2003; Krilanovich, 2007). Im Fastenzustand kann 3-OHB Konzentrationen von maximal 6-8 mmol/l erreichen. Die Acetoacetat (AcAc) Konzentrationen fallen mit einem Maximum zwischen 1 und 2 mmol/l deutlich geringer aus. Der pH-Wert verändert sich sowohl bei der ketogenen Diät als auch beim Fasten kaum (Cahill, 1970; Cahill & Veech, 2003; Walczyk & Wick, 2017). Bei der diabetischen Ketoazidose hingegen, welche durch eine Stoffwechselentgleisung bei Diabetes Typ 1 auftreten kann, verursachen fünf- bis zehnmal so hohe Ketonkörperkonzentrationen eine lebensgefährliche metabolische Azidose (Gershuni et al., 2018).

### **1.2.1 Therapeutisches Spektrum der ketogenen Diät**

Zur Behandlung der therapierefraktären Epilepsie ist die ketogene Diät besonders in der Pädiatrie bereits weltweit wissenschaftlich anerkannt (Boison, 2017; J. Freeman et al., 2006; Ulamek-Kozioł et al., 2019). Auch eine Wirksamkeit bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson ist bereits beschrieben (Veech et al., 2001). Die genauen antikonvulsiven und neuroprotektiven Wirkmechanismen bleiben jedoch immer noch unklar (Hartman et al., 2007; Sampaio, 2016). Diskutiert wird unter anderem eine protektive Wirkung der Ketonkörper gegen oxidativen Stress in Neuronen. Ketonkörper seien in der Lage das durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bedingte neuronale Zellsterben zu reduzieren (D. Y. Kim et al., 2007). Außerdem sei eine direkte antikonvulsive Wirkung der Ketonkörper auf Ebene der Neurotransmitter möglich. Calderon et al. konnten beispielsweise an Ratten in der Ketose eine verstärkte Ausschüttung von GABA ( $\gamma$ -Aminobutyric acid) und Agmatin, welches unter anderem NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat) blockiert, nachweisen (Calderon et al., 2017). Die ketogene Diät hat sich darüber hinaus als effektives Mittel zur Gewichtsreduktion erwiesen. In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2013 wird eine langfristig stärkere Gewichtsabnahme adipöser Patientinnen und Patienten bei Durchführung einer ketogenen Diät im Vergleich zu einer Ernährungsweise mit sehr geringem Fettanteil (LFD = low fat diet) beschrieben (Bueno et al., 2013).

Ein Einsatz bei chronischem Schmerz und Krebserkrankungen wird ebenfalls seit einigen Jahren diskutiert (Boison, 2017; Masino & Ruskin, 2013). Eine direkte Wirkung auf die Tumorzellen ergibt sich etwa durch den veränderten Stoffwechsel und die damit

verbundenen geringen Glucose- und Insulinspiegel (Weber et al., 2018). Der Warburg Effekt, der 1924 von Otto Warburg erstmalig beschrieben wurde, besagt, dass Tumorzellen auch unter ausreichenden Sauerstoffbedingungen bevorzugt Glucose zu Lactat verstoffwechseln (anaerobe Glykolyse) (Warburg, 1924). Durch die ketogene Diät wird folglich das bevorzugte Energiesubstrat der Tumorzellen genommen. Allein der Entzug von Kohlenhydraten reicht jedoch nicht aus, um die Tumorzellen abzutöten (Warburg et al., 1926). Der Energiebedarf der Tumorzellen kann weiterhin noch durch oxidative Phosphorylierung gedeckt werden, jedoch steht aufgrund ausbleibender hoher Glukosespiegel das Substrat für die Zellteilung nicht mehr im Überschuss zur Verfügung. Durch den Warburg-Effekt sind die Tumorzellen dennoch generell flexibler als normale Zellen und stärker unabhängig von möglichen Schwankungen der Sauerstoffversorgung (Epstein et al., 2017; Warburg et al., 1926). In den meisten Tumoren ist die Sauerstoffkonzentration mit einem Anteil von weniger als 2 % bekanntlich deutlich geringer als in physiologischen Geweben (McKeown, 2014).

Weitere mögliche antitumoröse Eigenschaften einer ketogenen Diät resultieren unter anderem aus der Funktion der Ketonkörper als Signalmoleküle und durch epigenetische Veränderungen im Sinne posttranslationaler Histonmodifikationen (Dabek et al., 2020; Ruan & Crawford, 2018; Weber et al., 2018; Xie et al., 2016). Auch in der Tumorthherapie kann eine Verminderung des oxidativen Stresses durch Ketonkörper von positivem Nutzen sein, da ROS (reactive oxygen species) die Progression und die Therapieresistenz der Tumoren begünstigen (Greco et al., 2016; Kumari et al., 2018; Pinto et al., 2018).

## 1.3 Ketonkörperstoffwechsel

### 1.3.1 Ketonkörpersynthese

Acetoacetat, Aceton und  $\beta$ -Hydroxybutyrat zählen zu den sogenannten Ketonkörpern, wobei es sich bei der Mehrheit, der im Blut zirkulierenden Ketonkörpern, um  $\beta$ -Hydroxybutyrat handelt. Die physiologische Ketonkörpersynthese (s. Abb. 3) in der Leber wird induziert durch ein reduziertes Angebot an Kohlenhydraten, durch längeres Fasten oder auch durch eine ketogene Diät. Innerhalb eines solchen Zustandes bezieht der Körper seine Energie zunächst weiterhin mittels Glykogenolyse und Gluconeogenese aus Glucose (Rassow et al., 2016). Hält dieser Zustand länger an und sind die Glykogenspeicher allmählich aufgebraucht, so wird die Lipolyse in den Fettspeichern stimuliert. Dies geschieht vermittelt über den niedrigen Insulin- bzw. den

im Gegenzug erhöhten Glucagonspiegel (Rui, 2014). Daraus hervor gehen freie Fettsäuren, die mittels der Carnitin-Acyltransferasen 1 und 2 und der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase in die hepatische mitochondriale Matrix befördert werden. Die freien Fettsäuren (FFA = free fatty acids) werden daraufhin in der  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-CoA verstoffwechselt. Acetyl-CoA wird normalerweise zur Energiegewinnung über Oxalacetat in den Zitratzyklus eingeschleust. Bei Kohlenhydratmangel dient unter anderem Oxalacetat als Substrat für die Gluconeogenese. Wenn nicht mehr ausreichend Oxalacetat für das erhöhte Angebot an Acetyl-CoA bereitsteht, wird die hepatische Ketonkörpersynthese stimuliert. Die Enzyme Acetyl-CoA-Acetyltransferase, Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase (HMGCS) und Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyase (HMGCL) katalysieren die Bildung von AcAc. Über eine enzymatisch unabhängige spontane Decarboxylierung kann aus AcAc Aceton entstehen, welches zu großen Teilen über die Nieren oder die Lunge eliminiert wird. 3-OHB hingegen entsteht durch die Reduktion von AcAc, die durch die  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (3-OHB-DH) mit NADH als Reduktionsmittel katalysiert wird (Dabek et al., 2020; Evans et al., 2017; Laffel, 1999; Rassow et al., 2016). Das NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnis in den Mitochondrien bestimmt die Bildung von 3-OHB aus AcAc (Berg et al., 2013).

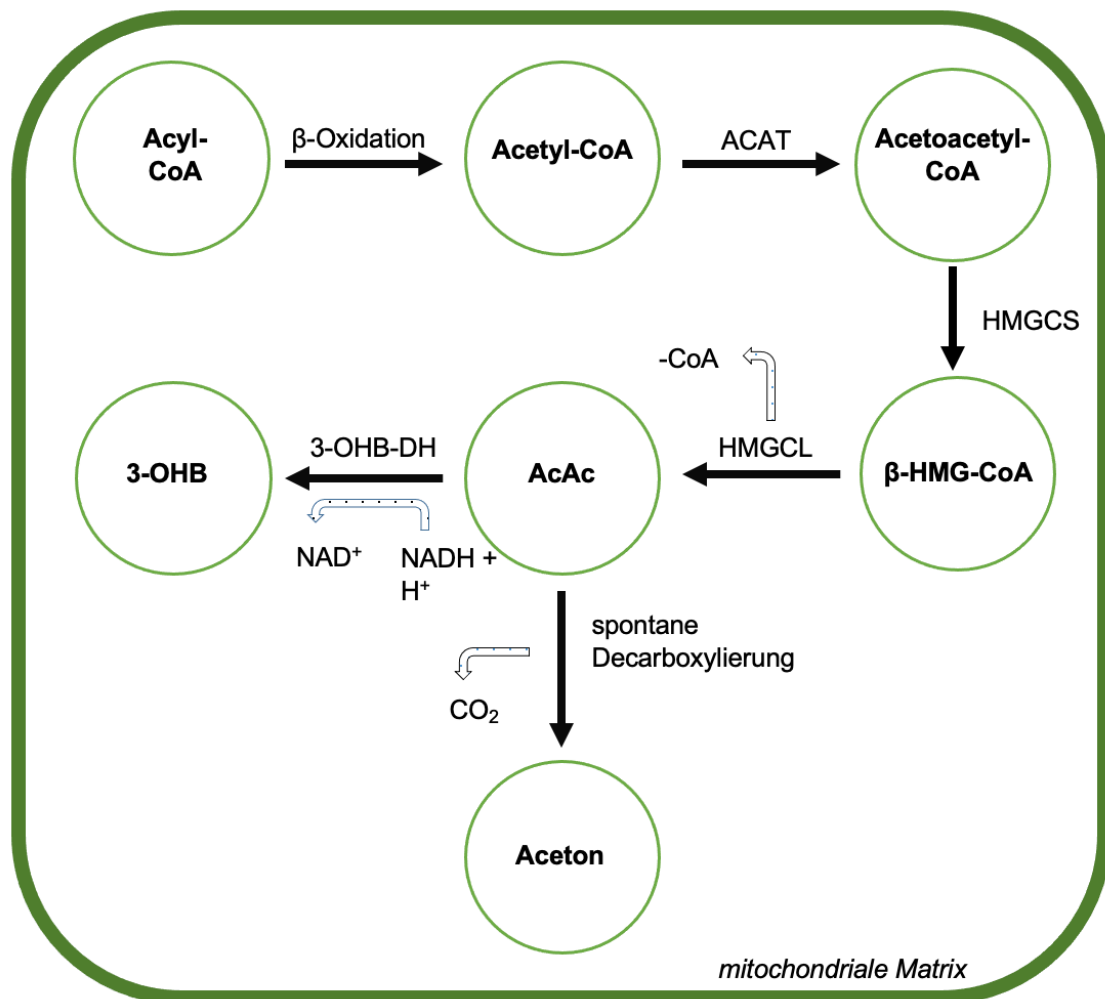


Abb. 3 - Ketonkörpersynthese. Ausgangspunkt der Ketogenese ist Acetyl-CoA, welches über die  $\beta$ -Oxidation aus freien aktivierten Fettsäuren gewonnen wird. Die Enzyme ACAT, HMGCS und HMGCL katalysieren die Bildung von AcAc. Durch spontane Decarboxylierung kann Aceton entstehen. Die 3-OHB-DH katalysiert eine  $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$  abhängige Reaktion, bei der 3-OHB hervorgeht. Die Ketonkörpersynthese findet in der mitochondrialen Matrix statt (Dabek et al., 2020; Evans et al., 2017; Rassow et al., 2016)

### 1.3.2 Verwertung der Ketonkörper

Die synthetisierten wasserlöslichen Ketonkörper werden über Diffusion ins Blut abgegeben und in das periphere Gewebe transportiert, wo sie über Monocarboxylattransporter (MCT) in die Zielzellen aufgenommen werden (Berg et al., 2013; Rassow et al., 2016). Sie können einen Großteil zur Energieversorgung des menschlichen Organismus beitragen. Besonders Gehirn, Herz- und Skelettmuskulatur



können Ketonkörper gut als alternative Energiequelle heranziehen. Der restliche Energiebedarf wird durch die hepatische Gluconeogenese bzw. über  $\beta$ -Oxidation der zirkulierenden freien Fettsäuren gedeckt (Gershuni et al., 2018). Die Ketonkörper können die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in Neuronen mit Glucose um den Beitrag zur Energiegewinnung konkurrieren (Valente-Silva et al., 2015; Walczyk & Wick, 2017). Das Gehirn kann Ketonkörper als Hauptenergiequelle nutzen. Im Zustand der Ketose bezieht es ca. 3/4 der benötigten Energie aus den Energieträgern (Berg et al., 2013).

Der Abbau der Ketonkörper findet in den Mitochondrien der Zielzellen statt. Katalysiert durch die 3-OHB-DH wird 3-OHB NAD<sup>+</sup> abhängig zu Acetoacetat oxidiert. Das Enzym 3-Ketoacyl-CoA-Transferase (SCOT) vermittelt die Aktivierung zu Acetoacetyl-CoA durch Übertragung eines Coenzym A von Succinyl CoA auf AcAc. Die Acetoacetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT, auch 3-Ketothiolase) katalysiert letztendlich unter Übertragung eines weiteren Coenzym A die Spaltung zu zwei Molekülen Acetyl-CoA, die zur Energiegewinnung in den Zitratzyklus eingeschleust werden können (Berg et al., 2013; Rassow et al., 2016; Voet et al., 2019) SCOT und ACAT sind die Schlüsselenzyme der Ketonkörperverwertung, wobei die durch SCOT katalysierte Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Laffel, 1999). Die Leber selbst kann Ketonkörper nicht zugunsten der Energiegewinnung verarbeiten, da ihr das Schlüsselenzym SCOT fehlt (Berg et al., 2013).

### **1.3.3 Monocarboxylat-Transporter**

Monocarboxylate, zu denen Lactat und Pyruvat aber auch die Ketonkörper 3-OHB und AcAc zählen, werden mittels der MCTs 1-4 proteingebunden über die zelluläre Plasmamembran transportiert. Aus dieser Transportfunktion ergibt sich nicht nur eine zentrale Rolle der MCTs für den Glukose-, Fett- und Ketonkörperstoffwechsel, sondern auch für die pH-Wert Regulation der Zellen. Sind alle MCTs für den Transport von Monocarboxylaten verantwortlich, unterscheiden sie sich dennoch hinsichtlich ihrer Substrataffinität und Gewebeverteilung (Halestrap & Meredith, 2004; Halestrap & Price, 1999). So ist MCT1 beispielsweise in beinahe allen Geweben vorhanden, besonders aber auf Zellen, welche die Metaboliten oxidativ verwerten können. MCT2 dagegen wird insgesamt in deutlich weniger Geweben, aber meist zusammen mit MCT1 exprimiert. MCT4 ist besonders auf Zellen zu finden, welche ihre Energie hauptsächlich aus der Glykolyse beziehen (z.B. weiße Skelettmuskelzellen, Leukozyten und auch Tumorzellen) und spielt dort eine große Rolle bei der Freisetzung des anfallenden

Lactats. MCT3 kommt exklusiv auf dem retinalen Pigmentepithel vor. Codiert werden die vier Transporter durch Gene der SLC16 (Solute Carrier 16) Familie (Halestrap, 2013; Halestrap & Price, 1999). Die höchste Affinität zu den Substraten Lactat, Pyruvat, 3-OHB und AcAC zeigt MCT2 (Bröer et al., 1999). Mit einer  $K_m$  (Michaelis-Menten-Konstante) von 12,5 mM hat MCT1 beispielsweise eine zehnfach geringere Affinität zu 3-OHB als MCT2 (Carpenter & Halestrap, 1994). MCT4 besitzt mit deutlich höheren  $K_m$ -Werten die geringste Affinität zu seinen Substraten (Dimmer et al., 2000).

Die Expression der MCTs spielt auch für Tumorzellen eine entscheidende Rolle: Bedingt durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1), welcher nicht nur durch die Hypoxie, sondern auch durch onkogene Signalwege angehäuft wird (Bardos & Ashcroft, 2004; Denko, 2008), kommt es zu einer gesteigerten Expression von MCT1 und MCT4 auf den Tumorzellen (Miranda-Goncalves et al., 2016; Perez de Heredia et al., 2010). Wie in 1.2.1 beschrieben beziehen Tumorzellen ihre Energie vorzugsweise aus der Glykolyse (Warburg, 1924). Durch nach außen gerichteten Transport des erzeugten Lactats mit Hilfe der MCTs kann der intrazelluläre pH-Wert reguliert und ein Überleben der Tumorzellen ermöglicht werden. Folge der starken Laktatfreisetzung der Tumorzellen ist außerdem eine Azidose des umliegenden Gewebes (Chiche et al., 2010). Diese wiederum ist assoziiert mit einer schlechten Prognose im Sinne einer verstärkten Tumorprogression, Metastasierung und Therapieresistenz (Ibrahim-Hashim & Estrella, 2019).

#### **1.3.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren 41, 43 und 109A**

Ketonkörper können als Liganden an den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPR) 41, 43 und 109A binden (Miyamoto et al., 2019; Offermanns, 2017; Xiong et al., 2004). Die Rezeptoren unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Funktion und Gewebeverteilung.

##### 1.3.4.1 GPR41 und GPR43

GPR41 und GPR43 sind mit G-Proteinen der Familie  $G_{i/o}$  gekoppelt. GPR43 kann darüber hinaus auch mit  $G_q$ -Proteinen gekoppelt sein (Le Poul et al., 2003; Tolhurst et al., 2012). Ligandenbindung führt über Hemmung der Adenylatzyklase zu einer Senkung des cAMP-(zyklisches Adenosinmonophosphat) Spiegels oder über Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zu einer erhöhten intrazellulären Kalzium-Konzentration (Le Poul et al., 2003).

Außer Ketonkörpern dienen auch SCFAs als Liganden für die beiden Rezeptoren, weshalb sie synonym auch als FFAR3 und FFAR2 (free fatty acid receptor 2 und 3) bezeichnet werden (Ang & Ding, 2016; Offermanns, 2014). Die SCFAs entstehen durch Zersetzung der Nahrung durch das im Darm ansässige Mikrobiom (Kimura et al., 2011). Beide Rezeptoren sind besonders stark auf Adipozyten exprimiert, wo eine Aktivierung unter anderem eine erhöhte Leptinproduktion bedingt (Ge et al., 2008; Xiong et al., 2004). Außerdem sind beide Rezeptoren auf enteroendokrinen Zellen des Darms zu finden, den sogenannten L-Zellen. Dort ist eine Ligandenbindung mit einer vermehrten Ausschüttung von GLP (Glucagon-like peptide) assoziiert (Tolhurst et al., 2012). GPR41 ist darüber hinaus besonders in sympathischen Ganglien des peripheren Nervensystems exprimiert. 3-OHB scheint dort antagonistisch über eine Herabregulation der Sympathikusaktivität zu wirken, während durch die Bindung von SCFAs an GPR41 wohl eine zunehmende sympathische Aktivierung erfolgt (Kimura et al., 2011). Auf Immunzellen (Nakajima et al., 2017), speziell auf Neutrophilen Granulozyten, konnte eine verstärkte Expression von GPR43 nachgewiesen werden (Le Poul et al., 2003). Der aktivierte Rezeptor scheint eine regulatorische Funktion innerhalb von Entzündungsprozessen zu erfüllen (Maslowski et al., 2009; Masui et al., 2013).

#### 1.3.4.2 GPR109A

GPR109A ist gekoppelt mit G-Proteinen der Familie  $G_{i/o}$ . Durch eine Ligandenbindung wird die Adenylatzyklase gehemmt, wodurch die cAMP Konzentration und folglich auch die Aktivität der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA) sinkt (Kostylina et al., 2008; Offermanns, 2006).

Als Agonisten an GPR109A wirken die Substanzen 3-OHB, Butyrat und Nikotinsäure (Taggart et al., 2005; Thangaraju et al., 2009; Tunaru et al., 2003). Eine Wirkung von AcAc an GPR109A ist nicht bekannt (Offermanns, 2006).

Exprimiert wird GPR109A unter anderem auf Adipozyten, wo eine Ligandenbindung die Lipolyse im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus inhibiert (Offermanns et al., 2011; Tunaru et al., 2003). Durch eine verminderte Aktivität der PKA, welche normalerweise die hormonsensitive Lipase (HSL) phosphoryliert und aktiviert, wird die Lipolyse in den Adipozyten gehemmt (Rassow et al., 2016). Neben den Adipozyten findet eine Expression von GPR109A ebenfalls auf Enterzozyten im Dün- und Dickdarm (Thangaraju et al., 2009) und auf Immunzellen (Offermanns et al., 2011) statt. Unter den Immunzellen kommt GPR109A auf neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und

epidermalen Langerhans-Zellen vor (Offermanns et al., 2011). Auf neutrophilen Granulozyten besitzt GPR109A eine vermeintlich regulatorische und damit auch antiinflammatorische Funktion bezüglich der Zellzahl. Hier konnte eine Induktion der Apoptose nach Rezeptoraktivierung nachgewiesen werden (Kostylina et al., 2008). Lukasova et al. beschreiben einen weiteren antiinflammatorischen Mechanismus von GPR109A auf Makrophagen. Nach Aktivierung des Rezeptors konnte eine geringere Expression von MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1), welches die Rekrutierung und Infiltration weiterer Immunzellen vermittelt, beobachtet werden (Lukasova et al., 2011). Die Expression von GPR109A auf Makrophagen kann wiederum durch das immunstimulierende Zytokin Interferon-gamma (INF-gamma) induziert werden (Schaub et al., 2001). Die Bindung der Liganden an GPR109A induziert die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (NLR family pyrin domain containing 3), welches unter anderem die Synthese des Zytokins Interleukin-18 (IL-18) stimuliert (Macia et al., 2015; Singh et al., 2014; Zaki et al., 2010). IL-18 erfüllt offenbar zytoprotektive Aufgaben und spielt eine wichtige Rolle für die Gesundheit des Darmepithels (Dupaul-Chicoine et al., 2010; Reuter & Pizarro, 2004). Diese Funktion in Enterozyten konnte ebenfalls für GPR43 nachgewiesen werden (Macia et al., 2015).

Nikotinsäure wurde auf Grund seiner antilipolytischen Wirksamkeit bis 2013 pharmakologisch als Lipidsenker eingesetzt. Typische Nebenwirkung bei Einnahme von Nikotinsäure ist Flush (Dellas, 2017). Diese Form der Hautrötung ist ebenfalls Folge einer Aktivierung von GPR109A nach Ligandenbindung (Benyo et al., 2005). Verantwortlich für die Vasodilatation ist eine gesteigerte Synthese der Prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), die aus der Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors auf epidermalen Langerhans-Zellen hervorgeht (Benyo et al., 2006; Benyo et al., 2005).

## 1.4 Tumorsuppressor p53

Bei p53 handelt es sich um ein Protein, welches aus 393 Aminosäuren besteht und seine Wirkung als Transkriptionsfaktor durch Bindung der DNA entfaltet (Levine, 1997). Das Protein, welches durch das Tumorsuppressor-Gen TP53 codiert wird, wurde im Zuge der Forschung an mit Simian-Virus 40 (SV-40) infizierten Zellen 1979 durch David Lane entdeckt. Es erhielt den Namen p53 auf Grund seines molekularen Gewichts von 53 kD (S. Kim & An, 2016). Das nicht virale Protein ist mehreren Forschungsgruppen im Zuge einer Immunopräzipitation des viralen Large T-Antigens in Form einer Komplexbildung der beiden Proteine aufgefallen (Levine & Oren, 2009). Bereits einige Jahre nach

Entdeckung fand man heraus, dass der Wildtyp (wt) von p53 in der Lage ist, das onkogene Potential von Zellen weitgehend zu unterdrücken (Finlay et al., 1989).

Normalerweise ist das p53-Protein sehr instabil und wird fortlaufend nach Ubiquitinierung in den Proteasomen abgebaut (Alberts et al., 2017). Als Antwort auf Stressvorgänge in der Zelle wie zum Beispiel DNA-Schäden, Hypoxie, oxidativem Stress und Fehlregulation in Signalwegen, welche für die Proliferation verantwortlich sind, wird eine posttranslationale Stabilisierung von p53 induziert (Weinberg, 2014). Aktivierte Proteinkinasen phosphorylieren p53, wodurch das Protein dem Ubiquitin vermittelten Abbau entgehen und folglich in größeren Konzentrationen akkumulieren kann (Alberts et al., 2017; Rassow et al., 2016). Stabilisiertes p53 wirkt als Transkriptionsfaktor (Alberts et al., 2017) und kann unter anderem über einen Zellzyklusarrest Reparaturmechanismen der DNA fördern oder durch Einleitung der Apoptose den gezielten Untergang der betroffenen Zellen bewirken, wobei die p53 Antwort abhängig von Art und Ausmaß des vorliegenden Schadens ist (Vousden & Prives, 2009).

Häufig nachgewiesen bei malignen Karzinomen, darunter auch Kolonkarzinomen, ist eine TP53 Missense-Mutation, die nicht nur den Verlust der Aktivität von p53 als Tumorsuppressor zur Folge hat, sondern auch durch eine Änderung der Aktivität, die Progression und Therapieresistenz des Tumors begünstigen kann (Oren & Rotter, 2010). Darüber hinaus stellen Missense-Mutation des einen und Allelverlust des anderen Allels am TP53-Lokus auf Chromosom 17p den kompletten Verlust des Schutzes durch p53 und einen entscheidenden Faktor der malignen Transformation von Tumoren dar (Baker et al., 1990; Oren & Rotter, 2010). Doch selbst bei noch vorhandenem Wildtyp-Allel, kann die Funktion des Genprodukts durch einige bekannte mutierte p53 Isoformen über einen dominant-negativen Effekt unterdrückt werden (Oren & Rotter, 2010). Insgesamt betrachtet ist TP53 das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Krebszellen. In fast 50 % aller menschlichen Krebsarten ist eine Punktmutation in diesem Gen zu finden (Weinberg, 2014). Bei Betrachtung der Häufigkeit von Mutationsort und Art der Mutation an verschiedenen Tumoren ergeben sich deutliche Unterschiede, was darauf schließen lässt, dass das Mutationsspektrum für p53 abhängig vom jeweiligen Tumorgewebe ist bzw., dass sich unterschiedliche Tumorarten durch verschiedene Punktmutationen von p53 ergeben (Hollstein et al., 1991). Besonders häufig von Mutationen betroffen sind sechs Aminosäurereste (sogenannte hotspots) innerhalb der Kerndomäne, die für die Bindung des Proteins an die DNA verantwortlich sind (Cho et al., 1994).

## 1.5 p21

Das Protein p21 ist über verschiedene Mechanismen in der Lage, den Zellzyklus anzuhalten, eine Zelldifferenzierung zu stimulieren und die zelluläre Seneszenz auszulösen (Abbas & Dutta, 2009; Georgakilas et al., 2017; Roninson, 2002). Neben den antiproliferativen Effekten besitzt p21 jedoch ebenfalls potenzielle onkogene Eigenschaften, welche eine Tumorprogression begünstigen können (Abbas & Dutta, 2009; Roninson, 2002).

Als Transkriptionsfaktor induziert p53 die Transkription von p21. Folglich wirkt p21 also als Vermittler einer p53-abhängigen Antwort auf DNA-Schäden einer Zelle (Alberts et al., 2017). Zellen ohne intaktes p21-Allel sind nicht in der Lage adäquat auf eine Stimulation durch p53 mit einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase zu reagieren (Waldman et al., 1995).

Eine direkte Bindung der Komplexe aus Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und Cyclinen durch p21 verhindert eine Progression des Zellzyklus, indem vorrangig der Übergang von der G1- in die S-Phase gestört wird (Alberts et al., 2017; Rassow et al., 2016). Ebenfalls direkt binden kann p21 das Protein Proliferating-Cell-Nuclear-Antigene (PCNA). Die konkurrierende Bindung von p21 an PCNA bewirkt einen Replikationsstopp und moduliert DNA-Reparaturprozesse (Abbas & Dutta, 2009; Parveen et al., 2016). Neben direkter Bindung kann p21 auch durch Modulation der Aktivität von Genen antiproliferativ wirken. Durch Regulation der Transkription von Genen, die Einfluss auf die Progression des Zellzyklus nehmen, kann der Zellzyklus effektiv gestoppt und die Seneszenz eingeleitet werden (Chang et al., 2000).

Abseits der antiproliferativen besitzt p21 ebenfalls onkogene Eigenschaften. Im Kontrast zur Hemmung der CDK-Komplexe begünstigt zytoplasmatisches p21 konzentrationsabhängig die Komplexbildung zwischen CDK4 und Cyclinen des Subtyps D. Dieser Komplex ermöglicht den Eintritt der Zelle in die S-Phase und damit eine Progression des Zellzyklus (LaBaer et al., 1997). Darüber hinaus wirkt p21 als positiver Regulator für Gene, welche wachstumsstimulierend und antiapoptotisch wirken können (Chang et al., 2000). Auch durch Bindung verschiedener pro-apoptotischer zytoplasmatischer Enzyme kann p21 den kontrollierten Zelltod inhibieren und letztlich die Karzinogenese begünstigen (Child & Mann, 2006; Cmielová & Rezáčová, 2011; Roninson, 2002). Ob und wie p21 als Onkogen fungiert, ist unter anderem abhängig vom vorliegenden Zelltyp, vom p53 Status und von der intrazellulären Verteilung von p21 (Abbas & Dutta, 2009; Cmielová & Rezáčová, 2011; Georgakilas et al., 2017; Piccolo & Crispi, 2012).

## 1.6 p27

p27 wird codiert durch das Gen CDKN1B (Cyclin dependent kinase inhibitor 1 B) (Chu et al., 2008). Wie p21 gehört auch p27 zu der CIP/KIP-Familie (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein) (Karimian et al., 2016). Die beiden Proteine verbindet ein ähnlicher Aufbau des N-Terminus, welcher über direkte Bindung die Inhibierung der CDK-Komplexe vermittelt. Seine antiproliferative Wirkung entfaltet p27 durch direkte Bindung des Cyclin D-CDK4- und des Cyclin E-CDK2-Komplexes, wodurch ein Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase erreicht und ein Übergang in die S-Phase verhindert wird (Toyoshima & Hunter, 1994). p27 kann dabei sowohl die Cycline als auch die CDKs binden (Russo et al., 1996). Experimentelle Studien an Mäusen zeigen, dass ein p27 Allelverlust mit Tumorentwicklung und -progression assoziiert ist (Fero et al., 1996; Park et al., 1999). Mutationen im Sinne eines Funktionsverlust beider Allele sind jedoch im Vergleich zu p53 sowohl für p21 als auch p27 sehr selten (Chu et al., 2008; Roninson, 2002; J. Slingerland & Pagano, 2000).

Reguliert werden kann p27 auf transkriptionaler, translationaler und vor allem auf post-translationaler Ebene (Abbastabar et al., 2018). Eine posttranslationale Phosphorylierung verhindert die direkte Interaktion zwischen p27 und den CDK-Komplexen. Darüber hinaus ist phosphoryliertes p27 erkennbar für Ubiquitin-Ligasen, welche das Protein zum Abbau markieren (Chu et al., 2008). Die Transkription von p27 wird unter anderem durch die Forkhead-Box-Proteine der Klasse O (FOXO-Proteine) reguliert. Die FOXO-Proteine binden als Transkriptionsfaktoren direkt an die DNA und fördern die Transkription von p27 (Abbastabar et al., 2018; Bertoli et al., 2009; Ho et al., 2012). Inhibiert werden kann dieser Vorgang durch die aktive Serin-/Threonin-Kinase Akt, welche die FOXO-Proteine phosphoryliert und eine Bindung an die DNA verhindert (Brunet et al., 1999).

Ebenso wie p21 besitzt p27 neben der Funktion als Tumorsuppressor vermeintlich onkogene Funktionen, die hauptsächlich mit einer Umverteilung des Proteins vom Zellkern ins Zytoplasma assoziiert sind (Serres et al., 2011). Gleichmaßen wie p21 fördert auch zytoplasmatisches p27 die Cyclin D-CDK4-Komplexbildung und damit ein Fortschreiten des Zellzyklus (LaBaer et al., 1997). Außerdem kann ein vermehrtes Vorkommen von p27 im Zytoplasma durch direkte Interaktion mit Rho-GTPasen die Ausrichtung des Zytoskeletts beeinflussen und die Zellmigration begünstigen. Durch diesen Mechanismus kann p27 zum invasiven Wachstum von Tumorzellen beitragen (Besson et al., 2004; Phillips et al., 2018). Eine Umverteilung von p27 vom Zellkern ins Zytoplasma wird unter anderem verursacht durch eine kontinuierliche Aktivität des Ras-

Onkogens und des PI3-Akt-Signalwegs (Calvayrac et al., 2019; X. Liu et al., 2000). Als Onkogen wirkt p27 demnach anscheinend nur in Verbindung mit anderen onkogenen Signalwegen (Serres et al., 2011). Im Gegensatz zu genannten onkogenen Signalwegen bekräftigt TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ) die protektiven Eigenschaften von p27, indem es seine Ansammlung im Zellkern und damit seine Wirkung als CDK-Inhibitor fördert (J. M. Slingerland et al., 1994; Suzuki et al., 2013).

## 1.7 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit ist es, einen möglichen Einfluss der physiologischen Ketonkörper 3-OHB und AcAc auf Kolonkarzinomzellen *in vitro* zu überprüfen. Hierbei wird durch Zugabe dieser Ketonkörper in physiologischen Konzentrationen die Wirkung auf die Proliferation, die Koloniebildung, die Genexpression von p53, p21 und p27, die Proteinexpression der Monocarboxylat-Transporter 1 und 4 sowie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren 41, 43 und 109A untersucht. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Ketonkörperwirkung und der Expression von p53 soll beleuchtet werden, indem alle Versuche an je drei Kolonkarzinomzelllinien mit jeweils unterschiedlichem p53-Status durchgeführt werden. Darüber hinaus soll ein möglich beeinflussender Effekt der Ketonkörper auf die Strahlensensibilität der jeweiligen Zelllinien getestet werden.

Alle Versuche werden neben normoxischen Bedingungen ebenfalls unter 1,5 % Sauerstoff durchgeführt, um eine tumorphysiologische Sauerstoffversorgung zu simulieren.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden von der Firma „Cell Line Service CLS“ aus Heidelberg (Deutschland) bezogen.

##### 2.1.1.1 Humane Kolonkarzinomzelllinien

Folgende Kolonkarzinomzelllinien wurden verwendet (s. Tabelle 1):

*Tabelle 1 - Verwendete Kolonkarzinomzelllinien in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe des Namens, des Zelltyps, der Spezies und des jeweiligen p53 Status. mut = Mutation. Glu = Glutaminsäure. Arg = Arginin. His = Histidin. wt = Wildtyp*

| <b>Name</b>    | <b>Zelltyp</b>             | <b>Spezies</b> | <b>p53 Status</b>                                    |
|----------------|----------------------------|----------------|--|
| <b>CaCo-2</b>  | Kolorektales Adenokarzinom | Homo sapiens   | -mut Codon 204<br>-Glu zu Stopp<br>-kein p53 Antigen |
| <b>HCT-116</b> | Kolorektales Karzinom      | Homo sapiens   | -wt  |
| <b>HT-29</b>   | Kolorektales Adenokarzinom | Homo sapiens   | -mut Codon 273<br>-Arg zu His<br>-p53 Überproduktion |

### 2.1.1.2 Sonstige verwendete Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in einigen Versuchen zur Protein- und Genexpressionsanalyse als Positivkontrollen verwendet (s. Tabelle 2):

*Tabelle 2 - Sonstige verwendete Zelllinien in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe des Namens, des Zelltyps, des Ursprungsgewebes und der Spezies. AML M5 = akute Monoblasten-/Monozytenleukämie.*

| <b>Name</b>    | <b>Zelltyp</b>     | <b>Gewebe</b>   | <b>Spezies</b> |
|----------------|--------------------|-----------------|----------------|
| <b>MCF-7</b>   | Adenokarzinom      | Weibliche Brust | Homo sapiens   |
| <b>SK-BR-3</b> | Adenokarzinom      | Weibliche Brust | Homo sapiens   |
| <b>THP-1</b>   | Monozyten (AML M5) | Blut            | Homo sapiens   |

### **2.1.2 Geräte und Verbrauchsutensilien**

Folgende Geräte und Verbrauchsutensilien wurden verwendet (s. Tabelle 3):

*Tabelle 3 - Verwendete Geräte und Verbrauchsutensilien in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe des Herstellers und des Firmensitzes*

| <b>Name</b>                   | <b>Hersteller (Firmensitz, Land)</b>        |
|-------------------------------|---|
| 25 Bg. Blottingpapier, B004   | A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland) |
| accu jet® pro Pipettierhelfer | Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland) |

|  |   |
|--|---|
| Analysenwaage Explorer®  | OHAUS Europe GmbH (Naenikon, Schweiz)                   |
| Arpege 110 Kryobehälter  | Air Liquide (Paris, Frankreich)                         |
| BioPhotometer, 8,5 mm  | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)                     |
| Cellstar® 96 Well Cell Culture Plate, V-bottom   | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)       |
| Cellstar® Polypropylen Röhrchen (15 und 50 ml, PP, konischer Boden, Schraubverschluss blau, Natur, graduiert, Schriftfeld, steril) | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)       |
| Cellstar® Zellkulturflaschen (250 ml, 75 cm <sup>2</sup> , PS, Filter-Schraubverschluss rot, transparent, steril)                  | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)       |
| CO <sub>2</sub> Incubator MCO-170AICUVD-PE   | Panasonic Corporation (Kadoma, Japan)                   |
| Combitips advanced® (1,0; 2,5; 5 und 10 ml)  | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)                     |
| Combitips plus® (2,5 und 10 ml)  | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)                     |
| Cryovial® T310-2A (2 ml)   | Simport® (Beloeil, Kanada)                              |
| Dermagrip® Nitrile Examination Gloves, Ultra Long  | WRP Asia Pacific Sdn Bhd (Salak Tinggi, Malaysia)       |
| Dri-Block® heater DB-2A  | Techne (Staffordshire, Vereinigtes Königreich)          |
| Duomax 1030 Schüttelgerät  | Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)           |
| EBA 12 Zentrifuge  | Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland) |
| Elektrophoresenetzgerät E455   | Consort (Turnhout, Belgien)                             |
| Elektrophoresenetzgerät EV265  | Consort (Turnhout, Belgien)                             |
| Eppendorf Thermomixer Comfort  | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)                     |
| epT.I.P.S.® Standard 100-5000 µl Pipettenspitzen   | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)                     |

|   |   |
|---|---|
| Gel-Dokumentationssystem WGD-30                   | witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, Deutschland)             |
| GENios™ Plus Mikroplatten-Reader                  | Tecan Trading AG (Männedorf, Schweiz)                       |
| Glaspipetten (5 und 10 ml)                        | VWR International, LLC (Radnor, USA)                        |
| HERAfreeze -86 °C Tiefkühlagertruhe HFU 586 Basic | Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)               |
| Hybridiser HB-1D                                  | Techne (Staffordshire, Vereinigtes Königreich)              |
| ImmunoSpot® S6 MACRO Analyzer                     | Cellular Technology Limited - CTL (Cleveland, USA)          |
| Lab Dancer Vortex                                 | IKA® (Staufen im Breisgau, Deutschland)                     |
| Luer-Lok™ Spritze, 20 ml                          | Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)                      |
| Microlance™ 3 Kanüle, 20 G                        | Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)                      |
| Mikroskop DM IRB                                  | Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)              |
| Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell    | Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)                  |
| Mr. Frosty™ Gefrierbehälter                       | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)                |
| MS1 Minishaker                                    | IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, Deutschland) |
| Multipipette® plus                                | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)                         |
| Multiply®-µStrip, 0,2 ml                          | Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)               |
| Neubauer improved Zählkammer                      | LO – Laboroptik Ltd. (Lancing, Großbritannien)              |
| Nitrocellulose Membrane, 0,2 µm                   | Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)                  |
| O <sub>2</sub> Control InVitro Glove Box          | Coy Laboratory Products, Inc. (Grass Lake, USA)             |

|   |   |
|---|---|
| Owl™ EasyCast™ B2 Minigel-Elektrophoresesystem            | Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)           |
| PIPETBOY Pippetierhelfer                                  | INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland)       |
| Präzisionswaage 510                                       | Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)                |
| Primus Linearbeschleuniger (6 MV, Dosisleistung 2 Gy/min) | Siemens Medical Solutions (Concord, USA)                |
| Research Pipetten (10, 20, 200 und 1000 µl)               | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)                     |
| Safe-Lock Tubes (1,5 ml und 2,0 ml)                       | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)                     |
| Shaking Platform POS-300                                  | Grant Instruments (Shepreth, Großbritannien)            |
| SterilGARD® Sicherheitswerkbank Klasse II, Typ A / B3     | Baker Company (Stanford, USA)                           |
| Thermocycler Primus 96 plus                               | MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland)                 |
| Transferpette® -8   | Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)             |
| Ultraschallbald Sonorex RK 100                            | BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland) |
| Universal 320R Zentrifuge                                 | Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland) |
| UV-Transilluminator TFX-20M                               | Vilber Lourmat (Collégien, Frankreich)                  |
| UVette® 220 nm – 1.600 nm<br>50 – 2.000 µl                | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)                     |
| Vertikales Doppelgelsystem                                | PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)      |
| Zellkulturtestplatte 24                                   | TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)   |
| Zellkulturtestplatte 48                                   | TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)   |

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Zellkulturtestplatte 96F | TPP Techno Plastic Products AG<br>(Trasadingen, Schweiz) |
|--------------------------|--|

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Folgende Chemikalien und Reagenzien wurden verwendet (s. Tabelle 4):

*Tabelle 4 - Verwendete Chemikalien und Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe des Herstellers und des Firmensitzes (Stadt, Land)*

| <b>Name</b>                                | <b>Hersteller (Firmensitz, Land)</b>   |
|--|--|
| Agarose SERVA                              | SERVA Electrophoresis GmbH<br>(Heidelberg, Deutschland)                        |
| Aqua                                       | B. Braun Melsungen AG (Melsungen,<br>Deutschland)                              |
| Trypsin / EDTA solution<br>0,05 % / 0,02 % | Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)  |
| (±)-Sodium 3-hydroxybutyrate               | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)   |
| Gentamycin 10 mg/ml                        | Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)  |
| Glucose 40 %                               | B. Braun Melsungen AG (Melsungen,<br>Deutschland)                              |
| RPMI Medium 1640, Glutamax™                | gibco® by life technologies™, Thermo<br>Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA) |
| RPMI Medium 1640, no glucose               | gibco® by life technologies™, Thermo<br>Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA) |
| Lithium acetoacetate                       | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)   |
| Lithium chloride                           | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)   |
| Cell Counting Kit-8 (WST-8)                | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)   |

|   |  |
|---|--|
| Freezing Medium Cryo-SFM                | PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)             |
| GoTaq® DNA Polymerase                   | Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)                 |
| GelRed®                                 | Biotium, Inc. (Fremont, USA)                         |
| DNA Gel Loading Dye (6X)                | Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)        |
| GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder           | Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)        |
| GBX Entwickler und Nachfülllösung       | Carestream Health, Inc. (Rochester, USA)             |
| GBX Fixierbad und Nachfülllösung        | Carestream Health, Inc. (Rochester, USA)             |
| Roti®-Quant (5X)                        | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)     |
| 4x Laemmli Sample Buffer                | Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)           |
| 10x Tris/Glycine/SDS (TGS) Buffer       | Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)           |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder    | Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)        |
| Towbin Buffer 10x                       | SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland) |
| Ponceau S solution                      | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)                       |
| TWEEN® 20                               | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)                       |
| 25x TBS (pH 7,4) (Tris-buffered saline) | Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)            |
| Magermilchpulver                        | Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)                  |
| Roti®Free Stripping-Puffer              | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)     |

|   |  |
|---|--|
| PhosSTOP™ EASYpack<br>Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets        | Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz)            |
| cOMplete™ EASYpack<br>EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets | Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz)            |
| Methanol (≥ 99,8 %)   | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)                   |
| TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer, 10X                                   | Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)             |
| Phosphate Buffered Saline (PBS)                                     | Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)              |
| Kristallviolett-Lösung  | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)                   |
| Natriumacetoacetat  | Alfa Chemistry (New York City, USA)              |
| Trypanblau  | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)   | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)                   |
| Cisplatin   | Teva Pharma AG (Basel, Schweiz)                  |
| DL-Dithiothreitol (DTT)   | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)                   |
| Luminol sodium salt   | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)                   |
| p-Coumaric acid   | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)                   |
| Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30 %            | Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)              |
| Pierce™ RIPA-Puffer   | Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)    |



## 2.1.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden verwendet (s. Tabelle 5):

*Tabelle 5 - Verwendete Antikörper in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe der Wirtsart, der verwendeten Verdünnung, des Herstellers und des Firmensitzes (Stadt, Land)*

| <b>Name</b>                                     | <b>Wirtsart</b>   | <b>Verwendete Verdünnung</b> | <b>Hersteller<br/>(Firmensitz, Land)</b>                          |
|---|-------------------|------------------------------|---|
| Anti-beta Actin Loading Control (HRP) (ab20272) | Maus (monoklonal) | 1 : 4.000                    | Abcam   |
| Anti-Lamin B1 (ab16048)                         | Hase (polyklonal) | 1 : 10.000                   | Abcam   |
| Anti-p21 (ab109199)                             | Hase (monoklonal) | 1 : 1.000                    | Abcam   |
| Anti-p27 Kip1 (D69C12) XP®                      | Hase (monoklonal) | 1 : 1.000                    | Cell Signaling Technology®<br>(Cambridge, Vereinigtes Königreich) |
| Anti-p53 (ab32389)                              | Hase (monoklonal) | 1 : 1.000                    | Abcam   |
| Goat Anti-Mouse IgG (HRP) (ab6721)              | Ziege             | 1 : 10.000                   | Abcam   |
| Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) (ab6721)             | Ziege             | 1 : 20.000                   | Abcam   |

## 2.1.5 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Folgende Primer wurden für die Genexpressionsanalysen verwendet (s. Tabelle 6):

*Tabelle 6 - Verwendete Primer in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe der Namen, der Sequenz und der Produktlänge in Basenpaaren. bp = Basenpaare. PBGD = Porphobilinogen-Deaminase.*

| <b>Gen</b>     | <b>Primer</b>          | <b>Sequenz (5' zu 3')</b> | <b>bp<br/>Amplifikat</b> |
|----------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>GPR41</b>   | FFAR3/GPR41<br>forward | CACCARCTATCTCACCGCCC      | 169                      |
|                | FFAR3/GPR41<br>reverse | TATGACGTAGACCACGCTGC      |                          |
| <b>GPR43</b>   | FFAR2/GPR43<br>forward | GCCTGGTGCTCTTCTTCATC      | 178                      |
|                | FFAR2/GPR43<br>reverse | AGGTGGGACACGTTGTAAGG      |                          |
| <b>GPR109A</b> | GPR109A forward        | GGACAACACTATGTGAGGCGTTGG  | 645                      |
|                | GPR109A reverse        | GGGCTGGAGAAGTAGTACACC     |                          |
| <b>MCT1</b>    | MCT1 forward           | GGAGGTCTTGGGCTTGCCTTCAACT | 790                      |
|                | MCT1<br>reverse        | CAACAAGGTCCATCAATGTTTCAA  |                          |
| <b>MCT4</b>    | MCT4<br>forward        | ACCAACCCTCCTGGCCATGGGA    | 396                      |
|                | MCT4<br>reverse        | GCCAAACCCAACCCCGTGATG     |                          |

|             |          |                           |     |
|-------------|----------|---------------------------|-----|
| <b>PBGD</b> | PBGD12/1 | GGAAGTGGCGAGCCAAGGACCAGGA | 240 |
|             | PBGD14/1 | AGGGACATGGATGGTAGCCTGCAT  |     |

### 2.1.6 Bausätze (Kits)

Folgende Bausätze (Kits) wurden verwendet (s. Tabelle 7):

*Tabelle 7 - Verwendete Bausätze (Kits) in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe des Herstellers, des Firmensitzes (Stadt, Land) und des Inhalts*

| <b>Name</b>                    | <b>Hersteller<br/>(Firmensitz, Land)</b>      | <b>Inhalt</b>  |
|--------------------------------|---|--|
| iScript™<br>cDNA Synthesis Kit | Bio-Rad Laboratories, Inc.<br>(Hercules, USA) | <ul style="list-style-type: none"> <li>- iScript Reaction Mix</li> <li>- iScript Reverse Transcriptase</li> <li>- Nuclease-Free Water</li> </ul>   |
| RNase-Free DNase Set           | Qiagen N.V.<br>(Venlo, Niederlande)           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- RNase-Free Water</li> <li>- Buffer RDD</li> <li>- DNase I, RNase-Free</li> </ul>  |
| RNeasy® Mini Kit               | Qiagen N.V.<br>(Venlo, Niederlande)           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- RNeasy Mini Spin Columns</li> <li>- Collection tubes (1,5 ml)</li> <li>- Collection tubes (2 ml)</li> <li>- Buffer RLT</li> <li>- Buffer RW1</li> <li>- Buffer RPE</li> <li>- RNase-Free Water</li> </ul> |

### 2.1.7 Gele

Folgende Gele wurden verwendet (s. Tabelle 8):

*Tabelle 8 - Verwendete Gele in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe des Herstellers und des Firmensitzes (Stadt, Land)*

| <b>Name</b>                          | <b>Hersteller (Firmensitz, Land)</b>          |
|--------------------------------------|---|
| Novex™ 8-16 % Tris-Glycine Mini Gels | Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA) |

### 2.1.8 Computer-Software

Folgende Softwares wurden verwendet (s. Tabelle 9):

*Tabelle 9 - Verwendete Softwares in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe des Herstellers und des Firmensitzes (Stadt, Land)*

| <b>Name</b>                         | <b>Hersteller (Firmensitz, Land)</b>             |
|-------------------------------------|--|
| Excel 2016                          | Microsoft Corporation (Redmond, USA)             |
| ImageJ – Version 1.4.8              | National Institute of Health (Bethesda, USA)     |
| ImageJ Plugin ColonyArea            | Turku Centre for Biotechnology (Turku, Finnland) |
| ImmunoCapture - Version 6.2         | Cellular Technology Limited (Cleveland, USA)     |
| PowerPoint 2016                     | Microsoft Corporation (Redmond, USA)             |
| Prism 6 for Windows – Version 6.0.5 | GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)          |
| WiseCapture II<br>Version 1.0.0.0   | Daihan Scientific Co., Ltd. (Wonju-si, Südkorea) |
| Word 2016                           | Microsoft Corporation (Redmond, USA)             |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeitsbedingungen

#### 2.2.1.1 Arbeit an Zellkulturen

Alle sterilen Arbeiten an den Zellkulturen wurden in der Klasse 2-Werkbank (Biological Safety Cabinet von SterilGARD) unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 2.2.1.2 Arbeit unter hypoxischen Bedingungen

Alle experimentellen Ansätze der Zellkultivierung wurden in zweifacher Ausführung erstellt, wobei ein Ansatz bei 21 % Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und der andere bei 1,5 % O<sub>2</sub> inkubiert wurde. Die Herstellung der hypoxischen Bedingungen erfolgte durch die Hypoxie-Werkbank, in welcher durch das Einfluten von Stickstoff die Sauerstoffkonzentration reguliert werden konnte. Die Temperatur in der Hypoxiekammer betrug 37 °C und die Kohlenstoffdioxid-(CO<sub>2</sub>) Konzentration 5 %. Alle weiteren Arbeiten an den Zellkulturen, welche bei 1,5 % O<sub>2</sub> inkubiert worden waren, fanden innerhalb der Hypoxiekammer unter sterilen Bedingungen statt.

#### 2.2.1.3 Arbeit zur Isolierung von RNA (Ribonukleinsäure)

Zur Isolierung der RNA wurde unter dem Abzug und auf Eis gearbeitet.

### 2.2.2 Herstellung der verwendeten Medien

#### 2.2.2.1 Anzuchtmedium

Die Züchtung der verwendeten Zelllinien in den Zellkulturflaschen erfolgte in RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™. Hinzugefügt wurde des Weiteren 1,1 ml Gentamicin (Endkonzentration 50 µg/ml) und fetales Kälberserum (FCS) in einer Endkonzentration von 10 %.

#### 2.2.2.2 G5-Medium

Ausgangspunkt für die Herstellung des G5 Mediums, welches für die Versuche benötigt wurde, war das RPMI 1640 Medium ohne Glucose. Dieses wurde mit 1,1 ml des Antibiotikums Gentamicin (Endkonzentration 50 µg/ml) und FCS in einer Endkonzentration von 10 %, was einer Menge von 50 ml entsprach, vermischt. Zusätzlich wurden 1250 µl 40 %iger Glucose hinzugefügt, was eine Gesamtkonzentration von 5 mM Glucose ergab.

### **2.2.3 Methoden der Zellkultur**

#### 2.2.3.1 Zellen aus der Kryokonservierung auftauen/ Neue Zellkultur anlegen

Die Zellen, welche zur Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff gelagert worden waren, wurden durch Eintauchen der Einfrierröhrchen in ein, mit lauwarmem Wasser gefülltes Becherglas, aufgetaut. Währenddessen wurden in die 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen 10 ml Medium hinzugegeben. 1 ml der mittlerweile aufgetauten Zellsuspension wurde dem Medium hinzugefügt. Die Zellkulturflaschen wurden daraufhin im Brutschrank (37 °C, 21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert.

#### 2.2.3.2 Trypsinbehandlung der Zellen

Zunächst wurde das Medium mittels einer 10 ml Pipette vollständig aus den Zellkulturflaschen entfernt und mit 5 ml PBS-Puffer (Phosphate-buffered saline-Puffer) ersetzt. Der PBS-Puffer wurde, nachdem er gründlich innerhalb der Flaschen über dem Zellrasen zum Abwaschen der Mediumreste verteilt worden war, wieder vollständig abgezogen. Daraufhin wurden 2 ml einer 0,05 %igen Trypsinlösung hinzugefügt, welche nach sorgfältigem Schwenken ebenfalls komplett abgezogen wurden. Die Zellkulturflaschen wurden dann 5 min im Brutschrank (37 °C, 21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Hierdurch wurden die Zellen vom Flaschenboden durch Enzymverdau abgelöst. Die nicht mehr adhärenen Zellen innerhalb der Zellkulturflaschen wurden erneut in Medium aufgenommen, mehrfach resuspendiert, um sie zu vereinzeln und anschließend je nach Absicht auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt (Splitten) oder eine bestimmte Menge für den weiteren Gebrauch in Zentrifugenröhrchen gegeben.

### 2.2.3.3 Kryokonservierung

Der erste Schritt für die Kryokonservierung der Zellen war die Trypsinbehandlung wie in 2.2.3.2 ausgeführt. Die mit Trypsin behandelten Zellen wurden in 6 ml Medium aufgenommen. 5 ml wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 1 ml in der Zellkulturflasche belassen, welche anschließend wieder mit 9 ml Medium aufgefüllt und erneut im Brutschrank (37 °C, 21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert wurde. Das Röhrchen wurde anschließend für 10 Minuten mit 260 x g zentrifugiert, so dass sich am Boden das Zellpellet absetzte. Im Anschluss daran wurde die überschüssige Flüssigkeit entsorgt, das Zellpellet in gewünschter Menge Kryomedium resuspendiert und in jeweils 1 ml auf die Kryoröhrchen verteilt. Die fertig angesetzten Kryoröhrchen wurden in einem Einfriergefäß 24 Stunden in einer Gefriertruhe bei -80 °C gelagert und am nächsten Tag in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

### 2.2.3.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde durch die Neubauer improved Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl 0,5 % Trypanblau vermischt. 10 µl dieses Gemischs wurden unter das Deckglas, welches so auf der Zählkammer positioniert wurde, dass die Newtonschen Ringe erkennbar waren, pipettiert. Die Auswertung der Zählkammer erfolgte durch die Auszählung der vier Großquadrate nach Angaben des Herstellers. Ein Großquadrat hat ein Volumen von 0,1 µl.

Die Zellzahl der Suspension wurde daraufhin mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen pro Großquadrat} \times 10^4 \times 2 (\cong \text{Verdünnung}) \times \text{ml der Zellsuspension}$$

### 2.2.3.5 Herstellung einer Verdünnungsreihe

Um die Wachstumseigenschaften der unterschiedlichen Zelllinien zu untersuchen, wurden vorab Verdünnungsreihen angesetzt (s. Abb. 4). Hierfür wurden je Zelllinie jeweils 8 well einer 96 well Platte mit 100 µl Zellsuspension mit aufsteigender Zellzahl pro Spalte befüllt (zum Beispiel 500, 1000, 1500 und 2000 Zellen). Nachdem die Zellen drei Stunden im Brutschrank inkubiert worden waren, wurden je well weitere 100 µl G5-Medium hinzugefügt, so dass pro well ein Gesamtvolumen von 200 µl hervorging. Einer der beschriebenen Ansätze wurde für vier Tage im Brutschrank unter 21 % O<sub>2</sub>, der andere für ebenfalls vier Tage unter 1,5 % O<sub>2</sub> inkubiert. Die lebenden Zellen wurden mit den Zellvitalitätsassays bestimmt. Nach Beurteilung der Zellproliferation wurden die

jeweiligen Zellzahlen festgelegt, die für zukünftige Versuche als Startpunkt dienen sollten.

|   | CoCa-2 |      |      |      | HCT-116 |       |       |       | HT29   |        |        |        |
|---|--------|------|------|------|---------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Z | 500    | 1000 | 1500 | 2000 | 500     | 1000  | 1500  | 2000  | 500    | 1000   | 1500   | 2000   |
|   | 1      | 2    | 3    | 4    | 5       | 6     | 7     | 8     | 9      | 10     | 11     | 12     |
| A | Red    | Red  | Red  | Red  | Green   | Green | Green | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow |
| B | Red    | Red  | Red  | Red  | Green   | Green | Green | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow |
| C | Red    | Red  | Red  | Red  | Green   | Green | Green | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow |
| D | Red    | Red  | Red  | Red  | Green   | Green | Green | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow |
| E | Red    | Red  | Red  | Red  | Green   | Green | Green | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow |
| F | Red    | Red  | Red  | Red  | Green   | Green | Green | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow |
| G | Red    | Red  | Red  | Red  | Green   | Green | Green | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow |
| H | Red    | Red  | Red  | Red  | Green   | Green | Green | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow |

Abb. 4 - 96-well Platte (schematische Darstellung) mit angesetzter Verdünnungsreihe der drei verwendeten Zelllinien (CaCo-2, HCT-116, HT-29) mit den jeweils ausgesäten Zellzahlen (=Z)

### 2.2.3.6 Behandlung von Zellkulturen durch Zusatz von Lösungen

Für das experimentelle Design der Versuche wurden die Zellen unter verschiedenen Konditionen in G5-Medium kultiviert.

Folgende Bedingungen mit beschriebenen Konzentrationen wurden erstellt:

- G5-Medium ohne weitere Zusätze (Kontrolle)
- G5-Medium mit 3-OHB in einer Endkonzentration von 3 mM
- G5-Medium mit Lithiumacetoacetat (LiAcAc) in einer Endkonzentration von 1,5 mM
- G5-Medium mit Lithiumchlorid (LiCl) in einer Endkonzentration von 1,5 mM
- G5-Medium mit DMSO (333:1) mit Natriumacetoacetat (NaAcAc) in einer Endkonzentration von 1,5 mM
- G5-Medium mit DMSO (333:1) ohne weitere Zusätze
- G5-Medium mit 3-OHB in einer Endkonzentration von 3 mM und LiAcAc in einer Endkonzentration von 1,5 mM



### 2.2.3.7 Zellpelletierung für PCR oder Western Blot

Um Zellpellets für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder einen Western Blot zu gewinnen, wurden die Zellen wie in 2.2.3.2 beschrieben zunächst geerntet. Die Zellen wurden jeweils in 5 ml G5-Medium aufgenommen und in ein steriles Röhrchen überführt. 10 ml PBS wurden jeweils hinzugefügt, was ein Gesamtvolumen von 15 ml ergab. Die Zellen wurden in einem nächsten Schritt durch Zentrifugation (280 x g, 10 min, 4 °C) pelletiert. Der flüssige Überstand wurde anschließend abgezogen und die Zellpellets jeweils in 2 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden jeweils auf zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt und erneut zentrifugiert (400 x g, 10 min, 4 °C). Der entstehende Überstand wurde mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle entfernt. Die entstandenen Pellets konnten bei -80 °C aufbewahrt werden.

### 2.2.3.8 Strahlenbehandlung von Zellkulturen

Um die Sensibilität der Zellen gegenüber Bestrahlung vergleichen zu können, wurden die unterschiedlichen Zellkulturen mit ionisierenden Strahlen im Sinne einer Radiotherapie behandelt. Die Bestrahlung erfolgte am zweiten Tag der Kultivierung in G5-Medium. Hierfür wurden die Zellkulturen in vorgewärmten Isolierboxen zur Klinik für Strahlentherapie des Uniklinikums Würzburg transportiert. Um gleiche Bedingungen für alle untersuchten Zellen zu schaffen und Fehler im experimentellen Design zu vermeiden, wurden ebenfalls die Kontrollen, welche nicht bestrahlt wurden (0 Gy), mittransportiert. Mit Hilfe eines Elektronen-Linearbeschleunigers wurden die Zellkulturplatten einer Strahlendosis von 2, 4, 6 oder 8 Gy ausgesetzt. Dabei wurde jede Platte einzeln bestrahlt und hierfür zentral im Feld positioniert.

## **2.2.4 Methoden der Zellvitalitätsassays**

### 2.2.4.1 WST-8 Test

Der WST-8 Test ist ein kolorimetrischer Assay zur Untersuchung der Zellvitalität, welcher mit Hilfe des Cell Counting Kits-8 (CCK-8) der Firma Sigma-Aldrich durchgeführt wurde. Auf einer 96-well Platte wurden pro well 100 µl einer Zellsuspension der Zelllinien CaCo-2 (3000 Zellen pro well), HCT-116 (1000 Zellen pro well) oder HT-29 (500 Zellen pro well) ausgesät. Zum Adhärenz wurden die Zellen für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde das Volumen pro well um 100 µl ergänzt und die in 2.2.3.6 beschriebenen Konditionen hergestellt. Die Zellkulturplatten wurden für vier Tage unter

normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) oder hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubiert. Hierauf erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 450 nm Wellenlänge durch das Mikroplatten-Photometer GENios Plus der Firma Tecan. Nachdem anschließend eine, durch den Hersteller definierte, Menge des WST-8 Reagenzes (10 µl je 100 µl Zellmedium) hinzugefügt worden war, wurden die Zellsuspensionen erneut bei 37 °C unter 21 % oder 1,5 % O<sub>2</sub> inkubiert. Nach 60 und nach 120 Minuten erfolgten jeweils weitere Messungen der OD.

#### 2.2.4.2 Kristallviolett-Test

Der Kristallviolett-Test ist ein Test zur Bestimmung der adhärennten Zellen innerhalb einer Zellsuspension. Er wurde entweder im Anschluss an den in 2.2.4.1 beschriebenen WST-8 Test oder zur Auswertung der Koloniebildung (s. 2.2.4.3) durchgeführt.

Die Zellkultur-Platten wurden hierfür zunächst über dem Waschbecken ausgeleert und darauffolgend auf Trockentüchern ausgeklopft, um die überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Zur Fixierung der am Boden anhaftenden Zellen wurden anschließend pro well 100 µl Methanol hinzugefügt. Die Platten wurden daraufhin für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Ausleeren und vorsichtigem Ausklopfen der Platten und einer Trockenzeit von 10 Minuten, wurden nun je well 100 µl der Kristallviolett-Lösung zugegeben, welche für weitere 10 Minuten in diesen belassen wurde. Nachfolgend wurde die Kristallviolett-Lösung mehrmals mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Die Platten mit den nun fixierten und angefärbten Zellen konnten im Mikroskop betrachtet und gegebenenfalls eingescannt werden. Darüber hinaus konnte in einem weiteren Schritt die OD mit Hilfe des Mikroplatten-Photometers bestimmt werden. Hierfür wurden die angefärbten Zellen mit je 100 µl 10 %iger Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH) für 30 Minuten auf einem Schüttler bei 150 rpm (revolutions per minute) lysiert. Die Messung der OD erfolgte bei 570 nm.

#### 2.2.4.3 Colony-Forming-Assay

Für den Colony-Forming-Assay (CFA) wurden zunächst zwei Ansätze mit je einer 48-well-Platte erstellt. Hierfür wurden je well 500 Zellen in 100 µl G5-Medium ausgesät. Zum Adhärennten der Zellen wurden die Ansätze für 4 Stunden im Brutschrank (37 °C, 21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Anschließend wurde das Gesamtvolumen pro well auf 200 µl erweitert und so die in 2.2.3.6 beschriebenen Lösungen hergestellt. Die Platten wurden unter Normoxie bzw. Hypoxie inkubiert, wobei nach fünf Tagen ein Mediumwechsel

stattfind. Nach 14 Tagen wurden die Versuche mittels Kristallviolett-Test gestoppt. Mit Hilfe des Immuno Spot S6 Macro Analyzers und der Software ImmunoCapture v6 2 wurden die Platten eingescannt. Die Auswertung der eingescannten Bilder erfolgte anschließend mit dem Plug-In für ImageJ „Colony Area“.

## **2.2.5 Genexpressionsanalyse**

### 2.2.5.1 RNA-Extraktion

Für die Extraktion der RNA aus den verwendeten Zelllinien wurden zunächst Zellpellets (s. 2.2.3.7) erstellt. Die Arbeitsschritte zur Extraktion der RNA fanden unter einem Abzug statt.

Die Arbeiten zur Gewinnung der RNA wurden mit dem „RNeasy Mini Kit“ und dem „RNase-Free DNase Set“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die isolierte RNA wurde nach anschließender Quantifizierung (s. 2.2.5.2) bei -80 °C eingefroren oder in einem nächsten Schritt direkt weiterverarbeitet.

### 2.2.5.2 Quantifizierung der RNA

Je 2 µl der zuvor gewonnenen RNA wurden mit je 98 µl RNase freiem A. dest vermengt und mittels UV-Küvetten im BioPhotometer quantifiziert.

### 2.2.5.3 cDNA-Synthese bzw. Reverse-Transkriptions-Reaktion

Die Reverse-Transkriptions-Reaktion wurde durchgeführt, um aus der isolierten RNA cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) zu synthetisieren. 500 ng jeder RNA Probe wurden mit dem „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ nach Herstellerangaben revers transkribiert.

Die entstandenen cDNA-Proben konnten bei -20 °C aufbewahrt werden.

### 2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht, mit Hilfe eines hinzugegebenen Primerpaares Sequenzen der cDNA zu amplifizieren, so dass diese in einem weiteren Schritt detektiert werden können. In vorliegender Arbeit wurden Primerpaare für die Rezeptorgene GPR-109a, GPR-41, GPR-43, MCT-1 und MCT-4 für die PCR verwendet, um die Anwesenheit von RNA zur Expression der Rezeptoren zu überprüfen. Außerdem wurden Primer für PBGD als Positiv-Kontrolle verwendet.

Der Reaktionsmix für die PCR wurde auf Eis in Multiply®-µStrip 0,2 ml Ketten angesetzt. Je Probe wurden 1 µl des Primer forward, 1 µl des Primer reverse, 12,5 µl der GoTaq® DNA-Polymerase, 1 bzw. 2 µl der zuvor synthetisierten cDNA und 9,5 bzw. 8,5 µl Aqua dest. (Aqua destillata) hinzugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 24 µl hervorging. Für jede Versuchsreihe wurden zusätzlich Negativ- sowie gegebenenfalls Positiv-Kontrollen erstellt. Für die Negativ-Kontrollen wurde das Hinzufügen der cDNA jeweils unterlassen und das fehlende Volumen durch Aqua dest. ersetzt. Für Positiv-Kontrollen wurde die cDNA, der zu untersuchenden Zellen, durch cDNA bestimmter Zelllinien ersetzt, welche die amplifizierten Sequenzen mit Sicherheit enthielten.

Folgende Schritte wurden in der PCR jeweils durchlaufen:

- 1) Initiale Denaturierung
- 2) Denaturierung
- 3) Primerhybridisierung
- 4) Elongation
- 5) Polymerisation

Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation wurden nach initialer Denaturierung in mehreren Zyklen wiederholt.

Die Einstellungen am Thermocycler für die Anzahl der Zyklen und die Temperatur für die Primerhybridisierung variierten je nach verwendetem Primer (s. Tabellen 10 und 11). Die Proben, welche die PCR durchlaufen hatten, konnten anschließend bei -20 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

Tabelle 10 - Schritte der PCR für die Primer PBGD, MCT-1 und MCT-4

|                                   | <u>PBGD</u>   | <u>MCT-1</u>  | <u>MCT-4</u>  |
|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| <u>Initiale Denaturierung</u>     | 94 °C, 5 min  | 94 °C, 5 min  | 94 °C, 5 min  |
| <u>Denaturierung</u>              | 94 °C, 30 sec | 94 °C, 30 sec | 94 °C, 30 sec |
| <u>Primerhybridisierung</u>       | 60 °C, 30 sec | 60 °C, 30 sec | 62 °C, 30 sec |
| <u>Elongation</u>                 | 72 °C, 30 sec | 72 °C, 30 sec | 72 °C, 30 sec |
| <u>Polymerisation</u>             | 72 °C, 10 min | 72 °C, 10 min | 72 °C, 10 min |
| <u>Anzahl der Zyklen</u>          | 32            | 36/38         | 36/38         |
| <u>Menge der verwendeten cDNA</u> | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl          |

Tabelle 11 - Schritte der PCR für die Primer GPR41, GPR43 und GPR109A

|                                   | <u>GPR41</u>  | <u>GPR43</u>  | <u>GPR109A</u> |
|-----------------------------------|---------------|---------------|----------------|
| <u>Initiale Denaturierung</u>     | 94 °C, 5 min  | 94 °C, 5 min  | 94 °C, 5 min   |
| <u>Denaturierung</u>              | 94 °C, 30 sec | 94 °C, 30 sec | 94 °C, 30 sec  |
| <u>Primerhybridisierung</u>       | 57 °C, 30 sec | 57 °C, 30 sec | 61 °C, 30 sec  |
| <u>Elongation</u>                 | 72 °C, 30 sec | 72 °C, 30 sec | 72 °C, 30 sec  |
| <u>Polymerisation</u>             | 72 °C, 10 min | 72 °C, 10 min | 72 °C, 10 min  |
| <u>Anzahl der Zyklen</u>          | 40            | 38            | 36/38          |
| <u>Menge der verwendeten cDNA</u> | 1 µl          | 2 µl          | 2 µl           |

#### 2.2.5.5 Gelelektrophorese

Um die zuvor durchgeführte PCR bewerten zu können, wurde eine Gelelektrophorese mit Hilfe eines 1,5 %igen Agarosegels durchgeführt. Das Agarosegel wurde mittels TBE-Puffer angesetzt und bei der Herstellung mit GelRed® in einer Verdünnung von 1:10.000 versetzt, was eine spätere Beurteilung des Gels unter UV-Licht ermöglichen sollte.

Zunächst wurde für jede zu untersuchende Probe 2 µl eines Ladepuffers in je ein well einer Spitzbodenplatte vorgegeben. Daraufhin wurden je 10 µl der PCR-Ansätze hinzugefügt, mit Hilfe der Pipettenspitze mit dem Ladepuffer vermennt und anschließend auf das Gel übertragen. Zusätzlich wurden 10 µl eines DNA-Standards (DNA-Leiter), welcher als Maßstab für die Bewertung der Fragmentgrößen diente, aufgetragen. Durch Anschließen eines Netzgeräts (120 V, 180 mA, 22 W) für 45 Minuten wurde ein elektrisches Feld erzeugt, in welchem die Basenpaare nach Größe aufgetrennt wurden. Der Erfolg der Gelelektrophorese konnte darauffolgend unter UV-Licht kontrolliert und mittels Geldokumentationssystem festgehalten werden.

## 2.2.6 Proteinexpressionsanalyse

### 2.2.6.1 Pufferlösungen

Zur Durchführung der Proteinexpressionsanalyse wurden verschiedene Pufferlösungen benötigt. Folgende Tabelle stellt die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen dar (s. Tabelle 12).

*Tabelle 12 - Zusammensetzung der Lösungen für die Proteinexpressionsanalyse*

| <b>Puffer</b>                                  | <b>Zusammensetzung</b>   |
|--|--|
| TBS-Puffer                                     | <ul style="list-style-type: none"><li>- 40 ml TBS (25x)</li><li>- 960 ml Aqua dest.</li><li>- 4 Tropfen TWEEN</li></ul>                      |
| Towbin-Puffer                                  | <ul style="list-style-type: none"><li>- 100 ml Towbin (10x)</li><li>- 700 ml Aqua dest.</li><li>- 200 ml Methanol</li></ul>                  |
| Lyse-Puffer (Pierce™ RIPA-Puffer)              | <ul style="list-style-type: none"><li>- 20 mM Tris-HCL pH 7,5</li><li>- 400 mM NaCl</li><li>- 1mM EDTA</li><li>- 0,5 % NP-40</li></ul>       |
| ECL-Lösung (Enhanced Chemiluminescence-Lösung) | <ul style="list-style-type: none"><li>- 10 ml Luminol</li><li>- 1 ml p-Coumaric</li><li>- 3 µl 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li></ul> |

### 2.2.6.2 Lyse der Zellpellets

Um die gewonnenen Zellpellets (s. 2.2.3.7) zu lysieren, wurden dem Lyse-Puffer Protease- und Phosphatase-Inhibitoren im Verhältnis 1:10 und DTT (Dithiothreitol) in einer Endkonzentration von 2 mM hinzugegeben. 300 µl der entstandenen Lösung wurden anschließend auf jedes der Pellets gegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Eppendorf-Gefäße einer 30-minütigen Ultraschallbehandlung in einem kalten Wasserbad ausgesetzt. Jene Behandlung wurde nach 15 Minuten einmalig unterbrochen, um die Proben auf dem Vortexmischer erneut zu vermengen. Nach dem Ultraschallbad wurden die Eppendorf-Gefäße bei 4 °C mit 11.000 x g für 10 Minuten

zentrifugiert. Das gewonnene Lysat konnte darauffolgend als Überstand in neue Eppendorf-Gefäße überführt werden.

#### 2.2.6.3 Bestimmung der Proteinmenge

Die quantitative Bestimmung der Proteine erfolgte mit Hilfe des Bradford-Tests. Hierfür wurden in neuen Eppendorf-Gefäßen je 5 µl Aqua dest. mit 5 µl des zuvor gewonnenen Lysats (s. 2.2.6.2) und 1 ml Roti®-Quant (1x) vermengt. Nach Überführung in Küvetten wurden die jeweiligen Proteinmengen bei 590 nm photometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle diente eine Probe, bei welcher das Lysat durch weitere 5 µl Aqua dest. ersetzt wurde.

Die Lysate konnten bei -80 °C aufbewahrt werden.

#### 2.2.6.4 Bestimmung der Lademenge

Um gleiche Bedingungen für die Versuche zu schaffen, wurde eine einheitliche Lademenge (20 µg) und ein einheitliches Ladevolumen (20 µl) festgelegt. Um dies zu gewährleisten, wurden die Lysate entsprechend mit Aqua dest. verdünnt. Im Folgenden wurden je Probe 5 µl Lämmli-Puffer, welcher zuvor mit DTT in einer Endkonzentration von 200 mM versetzt wurde, beigefügt. Das Endvolumen pro Lysat betrug demnach 25 µl.

#### 2.2.6.5 Denaturierung

Die auf eine einheitliche Lademenge verdünnten Lysate wurden fünf Minuten in einem Wasserbad auf 99 °C erhitzt, für 30 Sekunden auf Eis wieder abgekühlt und kurz an zentrifugiert (30 Sekunden). Die denaturierten Proben konnten für die Verwendung am nächsten Tag mit Kühlpad bei 4 °C im Kühlschrank oder für eine spätere Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

#### 2.2.6.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Page wurde durchgeführt, um die Proteine der Größe nach aufzutrennen. Als SDS-Gele wurden Novex™ 8-16 % Tris-Glycine Gele verwendet. Von genannten wurden jeweils zwei in einer Elektrophorese-Kammer angebracht, welche daraufhin mit dem TGS-Laufpuffer geflutet wurde. Die am Tag zuvor denaturierten Proben wurden auf die Gele übertragen (25 µl). Zusätzlich wurden 10 µl eines Proteinstandards in einzelne



Kammern der Gele gegeben, um eine spätere Beurteilung der Proteine zu ermöglichen. Die beschriebene Vorrichtung wurde im Kühlschrank unter 4 °C für 30 Minuten an ein Netzgerät angeschlossen (225 V, 150 mA, 35 W).

#### 2.2.6.7 Blotting

Als Blotting wird die Übertragung, der zuvor mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, auf eine Nitrocellulosemembran bezeichnet. Zunächst wurden Membran, Filterpapier und Schwämme für einige Minuten in Towbinpuffer eingeweicht, welcher als Transferpuffer diente. Das Gel wurde anschließend mit der Membran, dem Filterpapier und den Schwämmen in einer Transferkammer eingespannt. Nachdem die Transferkammer mit Transferpuffer gefüllt worden war, wurde durch Anschluss an ein Netzgerät (100 V, 350 mA, 35 W, 35 min) ein elektrisches Feld erzeugt, durch welches der Proteintransfer auf die Membran ermöglicht wurde. Der Erfolg des Blottings konnte im Anschluss durch Färbung der Membran mit Ponceau S kontrolliert werden. Nach Auswaschen mit TBS konnte die Membran bis zur weiteren Verwendung in Klarsichtfolie unter -20 °C aufbewahrt oder gleich weiterbearbeitet werden.

#### 2.2.6.8 Antikörperbehandlung

Die frisch behandelte oder aufgetaute Membran wurde nach erneutem Waschen unter Wippen für eine Stunde mit 5 %iger Magermilchlösung versetzt, welche als Blockierlösung für die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran dienen sollte. Nach einstündiger Inkubation wurde die 5 %ige Magermilchlösung durch 2 %ige ersetzt. Anschließend wurde die Membran mit einem Primärantikörper für das nachzuweisende Protein in entsprechender Konzentration versetzt und für 24 Stunden auf einer Laborwippe im Kühlschrank inkubiert.

Nach mehrmaligem Waschen mit TBS wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper versetzt, welcher in einem vorausgegangenem Schritt auch in 2 %iger Magermilch entsprechend verdünnt worden war. Für die später benötigte lumineszierende Wirkung sind Meerrettichperoxidasen (HRP) an die Antikörper konjugiert. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde auf der Laborwippe unter Raumtemperatur. Darauffolgend wurden die nicht gebundenen Antikörper in einem weiteren Waschvorgang mit TBS entfernt.

#### 2.2.6.9 Filmentwicklung

Für die Erzeugung der lumineszierenden Wirkung wurde die Membran für 3 Minuten mit einer ECL-Lösung behandelt. Die Peroxidase, welche an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, katalysiert dabei die Lumineszenz erzeugende Reaktion. Um das Ergebnis dokumentieren zu können, wurde anschließend ein Röntgenfilm entwickelt. Hierfür wurde ein Röntgenfilm im Inneren einer Röntgenkassette durch die lumineszierende Membran für 30 Sekunden lang belichtet. Die Entwicklung und Fixierung der Aufnahme erfolgte durch aufeinanderfolgendes Eintauchen des Films in Entwicklerlösung, ein Wasserbad und Fixierlösung in genannter Reihenfolge. Der fertig entwickelte Röntgenfilm wurde im Anschluss mit destilliertem Wasser gewaschen und zum Trocknen aufgestellt. Alle Arbeitsschritte zur Filmentwicklung erfolgten in einer Dunkelkammer.

Die Membran konnte bis zur erneuten Verwendung bei -20 °C eingefroren werden. Vor einer neuen Behandlung mit einem weiteren Primärantikörper musste diese jedoch zum Entfernen der bereits gebundenen Antikörper zunächst gestrippt werden. In diesem Fall wurde die aufgetaute Membran mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und danach für eine halbe Stunde in Roti-free-Stripping Puffer geschwenkt. Nach einem erneuten Waschvorgang mit TBS konnte die Membran nach den in 2.2.6.7 ausgeführten Schritten erneut behandelt werden, wobei sie in einem zweiten Durchgang vor Primärantikörperbehandlung nur noch 30 Minuten in 5 %iger Blockierlösung inkubiert werden musste.

#### **2.2.7 Statistische Auswertung**

Bei der Auswertung der Daten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwerts) verwendet. Zur graphischen Veranschaulichung und statistischen Auswertung der Ergebnisse diente das Softwareprogramm Prism 6. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert von kleiner als 0,05 angenommen. Der p-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Proteinexpressionsanalysen

Die Proteinexpressionsanalysen erfolgten an Zellen der Linien CaCo-2, HCT-116 und HT-29 und wurden wie in 2.2.6 beschrieben durchgeführt.

##### 3.1.1 p53

Abb. 5 zeigt die Proteinexpressionsanalyse für p53.

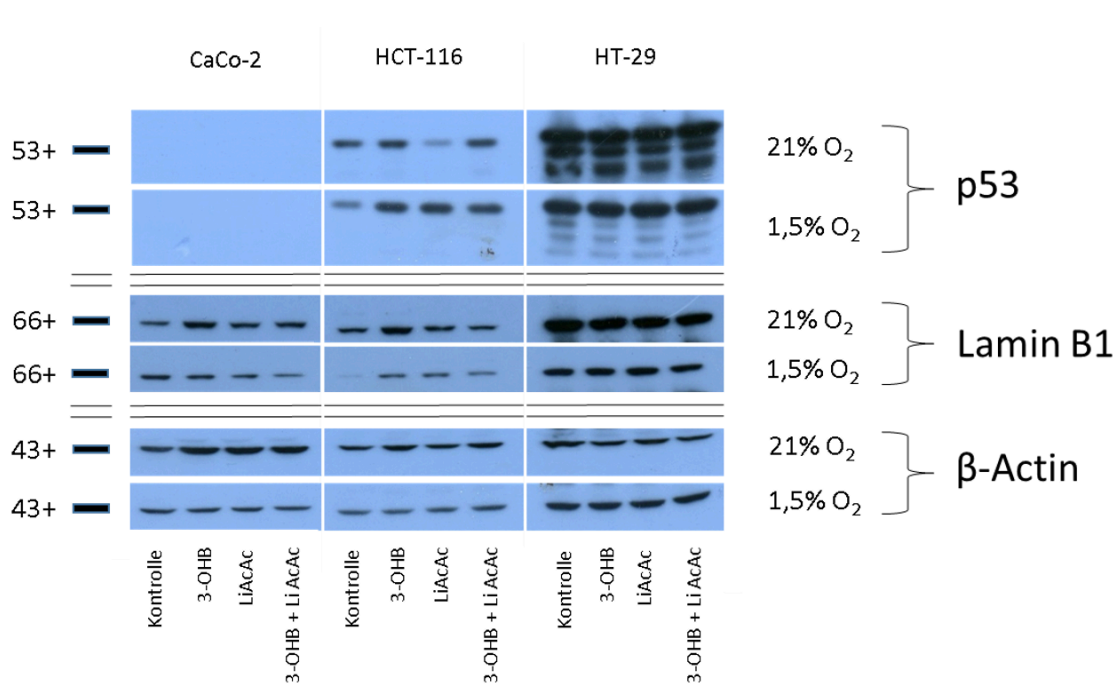


Abb. 5 - Proteinexpressionsanalyse: p53. Westernblot durchgeführt mit Lysaten der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT29. Die Zellen wurden unter folgenden Konditionen im Inkubator (21 % O<sub>2</sub>) oder der Hypoxiekammer (1,5 % O<sub>2</sub>) vier Tage vorkultiviert: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc, 3-OHB + LiAcAc (s. 2.2.3.6). Die Untersuchung auf Lamin B1 und beta-Actin diente der Ladekontrolle. Gezeigt ist je ein Beispiel von jeweils drei unabhängigen Testansätzen.

Bei den Zelllinien HCT-116 und HT-29 konnte das Tumorsuppressorprotein p53 mittels Westernblot für alle getesteten Konditionen nachgewiesen werden. Bei HT-29 waren die Banden besonders stark ausgeprägt, was am ehesten durch die mutationsbedingte Überproduktion von p53 bedingt war. Zudem konnten zahlreiche Nebenbanden beobachtet werden, die vermutlich Spaltprodukten, welche durch die p53 Überproduktion vermehrt angefallen waren, entsprachen. Bei CaCo-2 hingegen fiel der

Nachweis auf Grund der p53-Nonsense-Mutation negativ aus. Die Kultivierung unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) bzw. normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Verhältnissen scheint keinen Einfluss auf die Expression von p53 zu nehmen.

Der Nachweis von Lamin B1 und  $\beta$ -Actin diene der Ladekontrolle und fiel bei allen Zellen positiv aus. Die Bandenstärke für Lamin B1 variierte leicht innerhalb der Zelllinien. Besonders in der Kontrolle der Zelllinie HCT-116 fiel unter hypoxischen Bedingungen eine deutlich geringe Expression von Lamin B1 auf. Auf Grund dieser Unterschiede wurde eine weitere Ladekontrolle mit  $\beta$ -Actin durchgeführt. Die Banden für  $\beta$ -Actin waren gleichmäßig stark ausgeprägt.

### 3.1.2 p21 und p27

Die Proteinexpressionsanalysen für p21 und p27 sind in Abb. 6 dargestellt.

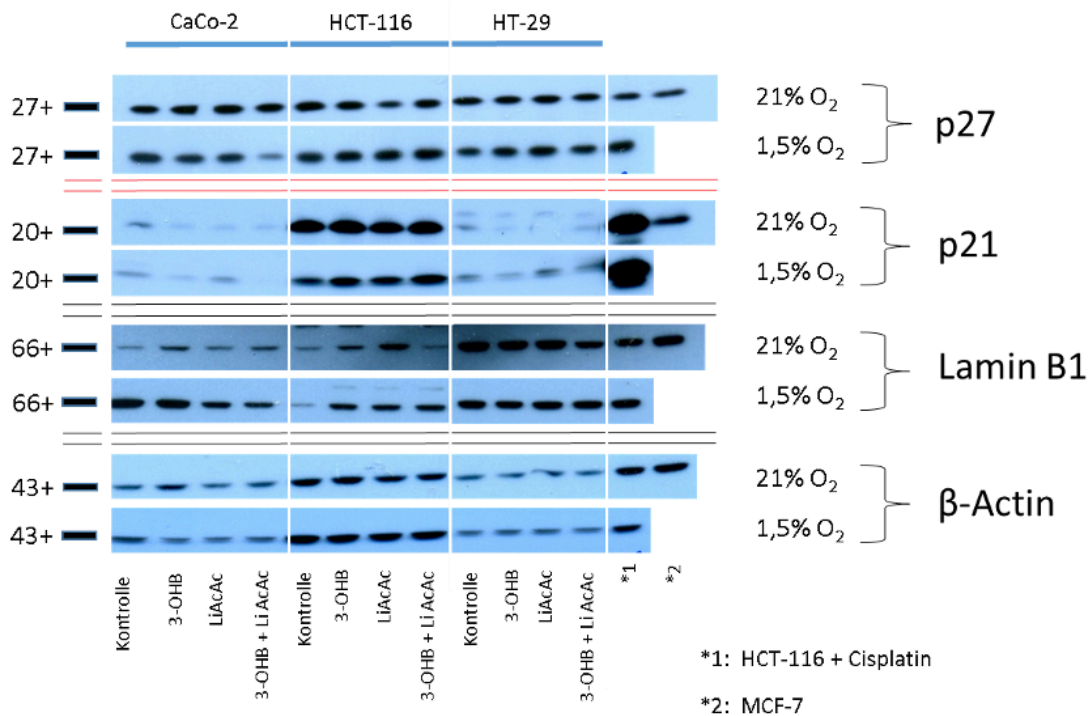


Abb. 6 - Proteinexpressionsanalyse: p27 und p21. Westernblot durchgeführt mit Lysaten der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29. Die Zellen wurden unter folgenden Konditionen im Inkubator (21 % O<sub>2</sub>) oder der Hypoxiekammer (1,5 % O<sub>2</sub>) vier Tage vorkultiviert: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc, 3-OHB + LiAcAc (s. 2.2.3.6). Als Positivkontrolle wurden MCF-7 Zellen und Zellen aus der Linie HCT-116, die zuvor fünf Tage lang in G5-Medium mit 30  $\mu$ M Cisplatin versetzt worden waren, verwendet. Die Untersuchung auf Lamin B1 und  $\beta$ -Actin diene der Ladekontrolle. Gezeigt ist je ein Beispiel von jeweils drei unabhängigen Testansätzen.

Durch die Westernblots konnten p21 und p27 in allen Zellen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen wurde p27 in allen getesteten Konditionen weitgehend gleichermaßen exprimiert. Die Bandenstärke weist auf eine deutlich stärkere Expression von p21 durch HCT-116 im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien hin. Bei HCT-116 scheint es außerdem, als bewirke die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen eine leicht verminderte Expression von p21. Der Nachweis von p21 bei den Zelllinien CaCo-2 und HT-29 fiel für die getesteten Konditionen unterschiedlich stark aus. Unter hypoxischen Bedingungen scheint p21 unter Kontrollbedingungen und unter Zugabe von LiAcAc stärker exprimiert zu werden.

Lamin B1 und  $\beta$ -Actin konnten im Rahmen der Ladekontrolle in allen getesteten Zellen nachgewiesen werden. Die Bandenstärke für Lamin B1 variierte leicht innerhalb der Zelllinien. Besonders in der Kontrolle der Zelllinie HCT-116 fiel sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen eine deutlich geringe Expression von Lamin B1 auf. Auch bei der CaCo-2 Kontrolle wurde Lamin B1 nach Kultivierung bei 21 % Sauerstoff geringer exprimiert. Auf Grund dieser Unterschiede wurde eine weitere Ladekontrolle mit  $\beta$ -Actin durchgeführt. Die Banden für  $\beta$ -Actin waren innerhalb der Zelllinien gleichmäßig stark ausgeprägt.

### 3.2 Genexpressionsanalysen

Die Genexpressionsanalysen dienten der Beurteilung von Zellen der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29. Als positive Referenz wurden ebenfalls Zellen der Zelllinien THP-1 und SK-BR-3 untersucht. Die Genexpressionsanalysen wurden wie in 2.2.5 beschrieben durchgeführt.

### 3.2.1 GPR41, GPR43 und GPR109A

Das Ergebnis der Genexpressionsanalyse nach PCR und Gelelektrophorese für die G-Protein gekoppelten Rezeptoren 41, 43 und 109A ist in Abb. 7 dargestellt.

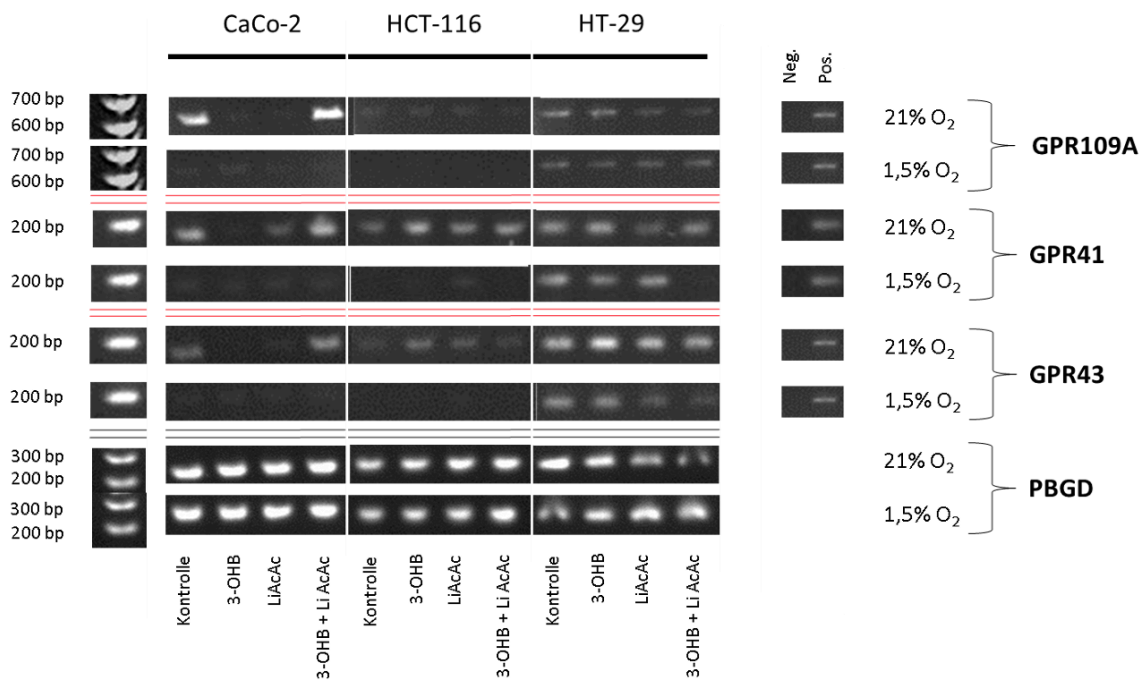


Abb. 7 - Genexpressionsanalyse: GPR41, GPR43 und GPR109A. Ergebnis der PCR nach Gelelektrophorese und Darstellung durch ein Geldokumentationssystem. Die cDNA für die PCR wurde aus Zellen der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29, welche unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) oder normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen vorkultiviert worden waren, gewonnen. Dabei wurden folgende Konditionen hergestellt (2.2.3.6): Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und eine Kombination aus 3-OHB und LiAcAc. Als Positivkontrolle (pos.) diente cDNA der Zelllinie THP-1. Für eine negative Kontrolle (neg.) wurde dem Reaktionsmix keine cDNA hinzugegeben. Zur Qualitätskontrolle der verwendeten cDNA wurde die Expression des Haushaltsgens PBGD untersucht. Dargestellt ist je ein Beispiel von jeweils drei unabhängigen Testläufen. bp = Basenpaare

Für alle drei Zelllinien konnte die Expression der Gene für die G-Protein gekoppelten Rezeptoren 41, 43 und 109A nachgewiesen werden. Die Expression fiel dabei je nach Kondition und Sauerstoffversorgung unterschiedlich stark aus. Nach der Vorkultivierung unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) Bedingungen konnte besonders bei den Zelllinien CaCo 2 und HCT-116 eine allgemein geringere mRNA-Expression (messenger RNA-Expression) im Vergleich zu den Zellen, welche bei 21 % inkubiert worden waren, beobachtet werden. Bei CaCo2 suggeriert die Bandenstärke eine besonders starke

Expression unter normoxischen Kontrollbedingungen und unter Zugabe von 3-OHB zusammen mit LiAcAc.

Die Expression des Haushaltsgens PBGD konnte für die drei Zelllinien für alle Konditionen gleichermaßen nachgewiesen werden.

### 3.2.2 MCT-1 und MCT-4

In allen drei Zelllinien konnte die mRNA-Expression für beide untersuchten Transporter nachgewiesen werden (s. Abb. 8). Die Vorkultivierung unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) Bedingungen scheint nur für die Expression des MCT-1-Gens im Sinne einer leicht abgeschwächten Bandenstärke relevant zu sein. Die unterschiedlichen Testkonditionen hatten größtenteils keinen Einfluss. Lediglich die MCT-4-Genexpression von CaCo-2 Zellen, welche bei 1,5 % Sauerstoff unter Zugabe von LiAcAc inkubiert worden waren, zeigte sich leicht vermindert.

Die Expression des Haushaltsgens PBGD konnte für die drei Zelllinien für alle Konditionen gleichermaßen nachgewiesen werden.

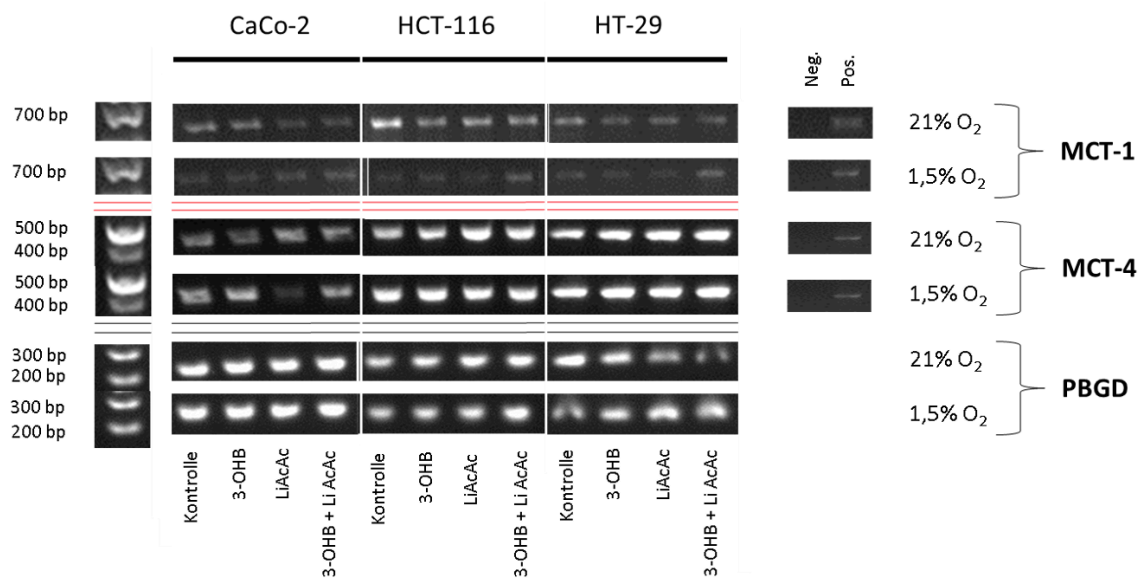


Abb. 8 - Genexpressionsanalyse: MCT-1 und MCT-4. Ergebnis der PCR nach Gelelektrophorese und Darstellung durch ein Geldokumentationssystem. Die cDNA für die PCR wurde aus Zellen der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29, welche unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) oder normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen vorkultiviert worden waren, gewonnen. Dabei wurden folgende Konditionen hergestellt (2.2.3.6): Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und eine Kombination aus 3-OHB und LiAcAc. Als Positivkontrolle (pos.) diente cDNA der Zelllinie SK-BR-3. Für eine negative Kontrolle (neg.) wurde dem Reaktionsmix keine cDNA hinzugegeben. Zur Qualitätskontrolle der verwendeten cDNA wurde die Expression des Haushaltsgens PBGD untersucht. Dargestellt ist je ein Beispiel von jeweils drei unabhängigen Testläufen. bp = Basenpaare

### 3.3 Einfluss von Lithium auf die Zellproliferation

Da AcAc vorrangig als Lithiumsalz im Handel erhältlich ist, sollte ein möglicherweise störender Einfluss des Lithiums innerhalb der Verbindung untersucht werden.

#### 3.3.1 Zellvitalitätssays mit LiCl

Die Analyse der Zellvitalität (Mittelwert der optischen Dichte  $\pm$  SEM) unter Zugabe von LiCl diente der Untersuchung einer möglichen Einflussnahme des Lithiums innerhalb der Verbindung LiAcAc auf die Zellproliferation der getesteten Zelllinien. Hierfür wurden die Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29 jeweils unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) und normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen vier Tage vorkultiviert. Die Konditionen Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und LiCl waren zuvor hergestellt worden.

##### 3.3.1.1 WST-8 Test

Abb. 9 zeigt die Ergebnisse des WST-8 Tests für die getesteten Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29.

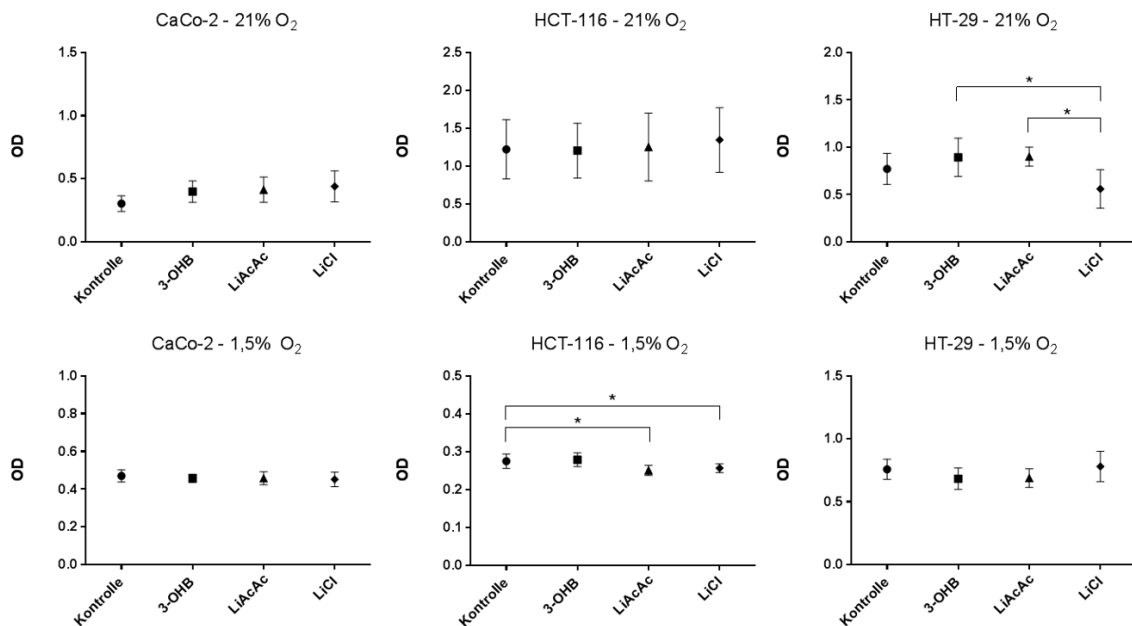


Abb. 9 - Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc, LiCl. WST-8-Test. Die Vorkultivierung (s. 2.2.3.6) erfolgte unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) oder normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen. Die OD wurde eine (21 % O<sub>2</sub>) bzw. zwei (1,5 % O<sub>2</sub>) Stunden nach Hinzufügen des WST-8 Reagenzes bestimmt. Mittelwert  $\pm$  SEM von je acht parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



## CaCo-2

Bei CaCo-2 traten zwischen den Konditionen keine signifikanten Unterschiede auf.

## HCT-116

Nach Vorkultivierung unter 1,5 % Sauerstoff waren signifikante Unterschiede zwischen den Konditionen zu beobachten. Die Proliferation der Zellen unter Zugabe von LiAcAc ( $0,25 \pm 0,005$ ,  $p < 0,05$ ) und LiCl ( $0,26 \pm 0,004$ ,  $p < 0,05$ ) war signifikant geringer als in der Kontrollgruppe ( $0,28 \pm 0,007$ ). Die Konditionen LiAcAc und LiCl unterschieden sich kaum voneinander.

## HT-29

Die untersuchte Zellproliferation unter normoxischen Bedingungen und unter Zugabe von LiCl ( $0,56 \pm 0,072$ ) war signifikant geringer als unter Zugabe von 3-OHB ( $0,89 \pm 0,072$ ,  $p < 0,01$ ) und LiAcAc ( $0,90 \pm 0,036$ ,  $p < 0,01$ ). Dies ist der einzige Ansatz, in welchem sich signifikante Unterschiede zwischen LiAcAc und LiCl zeigten.

### 3.3.1.2 Kristallviolett-Test

Abb. 10 zeigt die Ergebnisse des Kristallviolett-Tests für die untersuchten Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29.

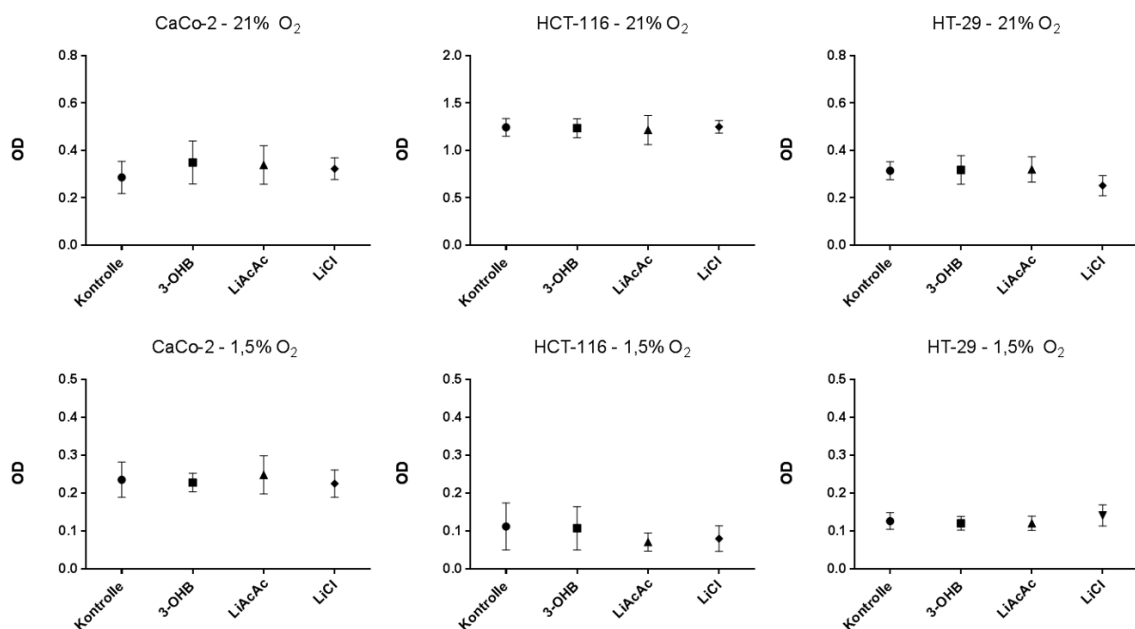


Abb. 10 - Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc, LiCl. Kristallviolett-Test. Die Vorkultivierung (s. 2.2.3.6) erfolgte unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) oder normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen. Mittelwert  $\pm$  SEM von je acht parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Es konnten bei keiner der untersuchten Zelllinien signifikante Unterschiede bezüglich der Zellproliferation zwischen den getesteten Konditionen festgestellt werden.

### 3.3.2 Zellvitalitätsassays mit Natriumacetoacetat (NaAcAc)

Auf Grund leicht konträrer Ergebnisse bei den Zellvitalitätsassays mit LiCl, sollte in einem nächsten Schritt die Zellproliferation unter Zugabe des Natriumsalzes von AcAc (NaAcAc) mit der Zellproliferation unter Zugabe von LiAcAc verglichen werden. Die Zellvitalität wurde mittels WST-8-Test nach viertägiger Kultivierung bestimmt. Bei keiner der getesteten Zelllinien ergaben sich Unterschiede zwischen den Konditionen NaAcAc und LiAcAc (s. Abb. 11). Die Sauerstoffbedingungen beeinflussten dieses Ergebnis nicht.

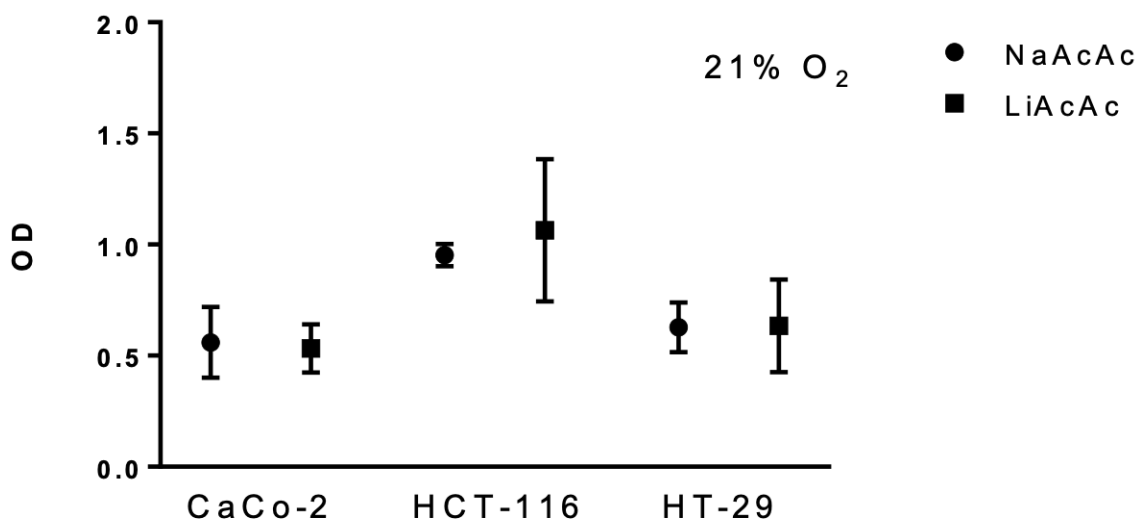


Abb. 11 - Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: NaAcAc und LiAcAc. WST-8-Test. Die Vorkultivierung (s. 2.2.3.6) der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29 erfolgte unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) oder normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen. Die OD wurde eine (21 % O<sub>2</sub>) bzw. zwei (1,5 % O<sub>2</sub>) Stunden nach Hinzufügen des WST-8 Reagenzes gemessen. Mittelwert ± SEM von je acht parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

Da das Natriumsalz von AcAc im Gegensatz zu LiAcAc in DMSO gelöst werden musste, wurde ebenfalls ein möglicherweise störender Einfluss des DMSOs untersucht. In Abb. 12 ist zu sehen, dass die alleinige Zugabe von DMSO keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Zellzahl bewirkte.

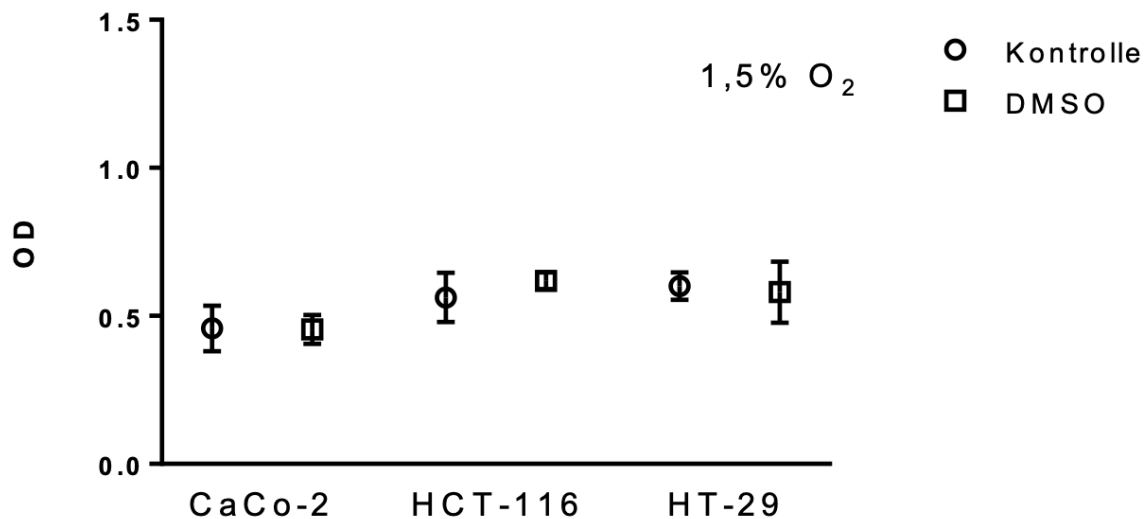


Abb. 12 - Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: Kontrolle und DMSO. WST-8-Test. Die Vorkultivierung (s. 2.2.3.6) der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29 erfolgte unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) oder normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen. Die OD wurde eine (21 % O<sub>2</sub>) bzw. zwei (1,5 % O<sub>2</sub>) Stunden nach Hinzufügen des WST-8 Reagenzes gemessen. Mittelwert  $\pm$  SEM von je acht parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Nach Durchführung dieser Versuche kann ein störender Einfluss von Lithium auf die Zellproliferation mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, weshalb solcher nachfolgend nicht weiter berücksichtigt wurde. Auf Grund der geringen Verfügbarkeit sowie der chemischen Instabilität des Natriumsalzes von AcAc wurden die Versuche mit LiAcAc fortgeführt.

### 3.4 Einfluss der Ketonkörper auf die Zellproliferation

Um einen möglichen Einfluss der Ketonkörper 3-OHB und AcAc auf das Tumorwachstum und die Proliferation der Tumorzellen feststellen zu können, wurden nachfolgende Versuche durchgeführt. Eine Kombination aus den Konditionen 3-OHB und LiAcAc diente dabei der Untersuchung einer möglichen synergistischen Wirkung der beiden Substanzen. Die Zellvitalität (Mittelwert der optischen Dichte  $\pm$  SEM) wurde nach

einer viertägigen Kultivierung in 96-well Platten unter den Konditionen mittels WST-8- und Kristallviolett-Test bestimmt.

### 3.4.1 WST-8-Test

Die Ergebnisse der kolorimetrischen Bestimmung der lebenden Zellen für die Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29 sind in Abb. 13 dargestellt.

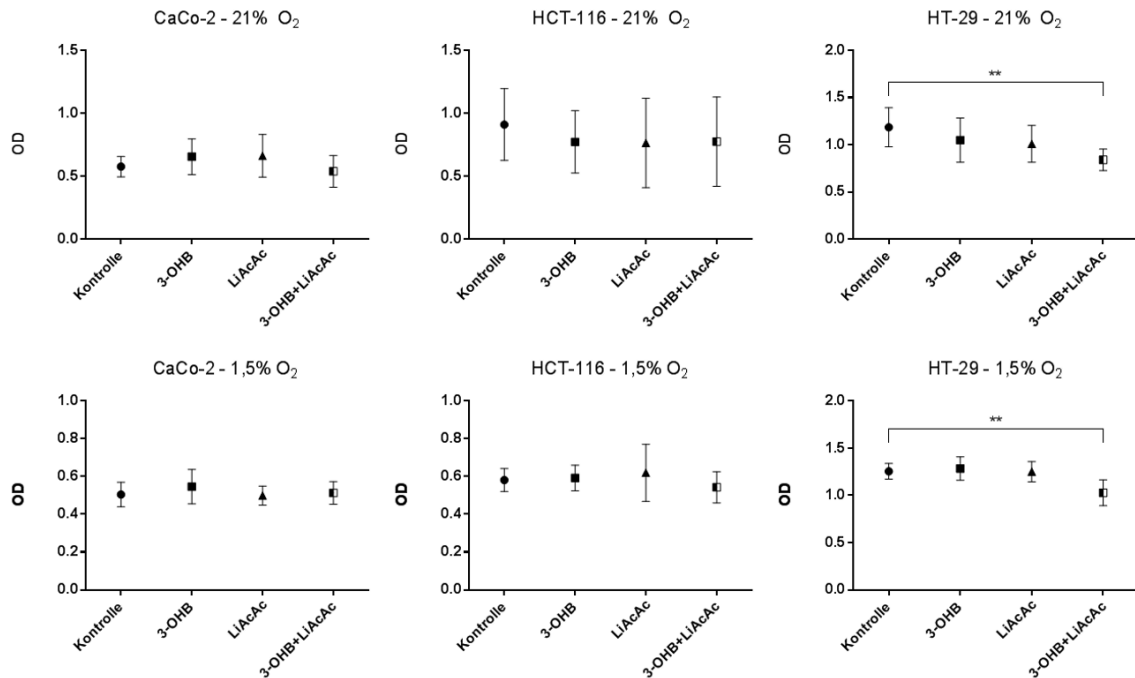


Abb. 13 - Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und 3-OHB + LiAcAc. WST-8-Test. Die Vorkultivierung (s. 2.2.3.6) der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29 erfolgte unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) oder normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen. Die OD wurde eine (21 % O<sub>2</sub>) bzw. zwei (1,5 % O<sub>2</sub>) Stunden nach Hinzufügen des WST-8 Reagenzes gemessen. Mittelwert ± SEM von je acht parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

## CaCo-2

Zwischen den getesteten Konditionen traten weder unter hypoxischer noch unter normoxischer Vorkultivierung signifikante Unterschiede auf.

## HCT-116

Auch bei der Zelllinie HCT-116 hatten die Ketonkörper in den verwendeten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation.

## HT-29

Unter normoxischen Bedingungen war die Zellvitalität nach Zugabe von 3-OHB zusammen mit LiAcAc ( $0,84 \pm 0,040$   $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $1,19 \pm 0,073$ ) signifikant geringer. Auch unter 1,5 % Sauerstoff war eine signifikante Reduktion der Zellvitalität nach Behandlung mit 3-OHB in Kombination mit LiAcAc ( $1,03 \pm 0,048$ ,  $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $1,26 \pm 0,032$ ) zu beobachten. Die anderen Konditionen unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle.

### 3.4.2 Kristallviolett-Test

In Abb. 14 ist erkennbar, dass durch den Kristallviolett-Test für keine der untersuchten Zelllinien Unterschiede bezüglich der Zellproliferation festgestellt werden können.

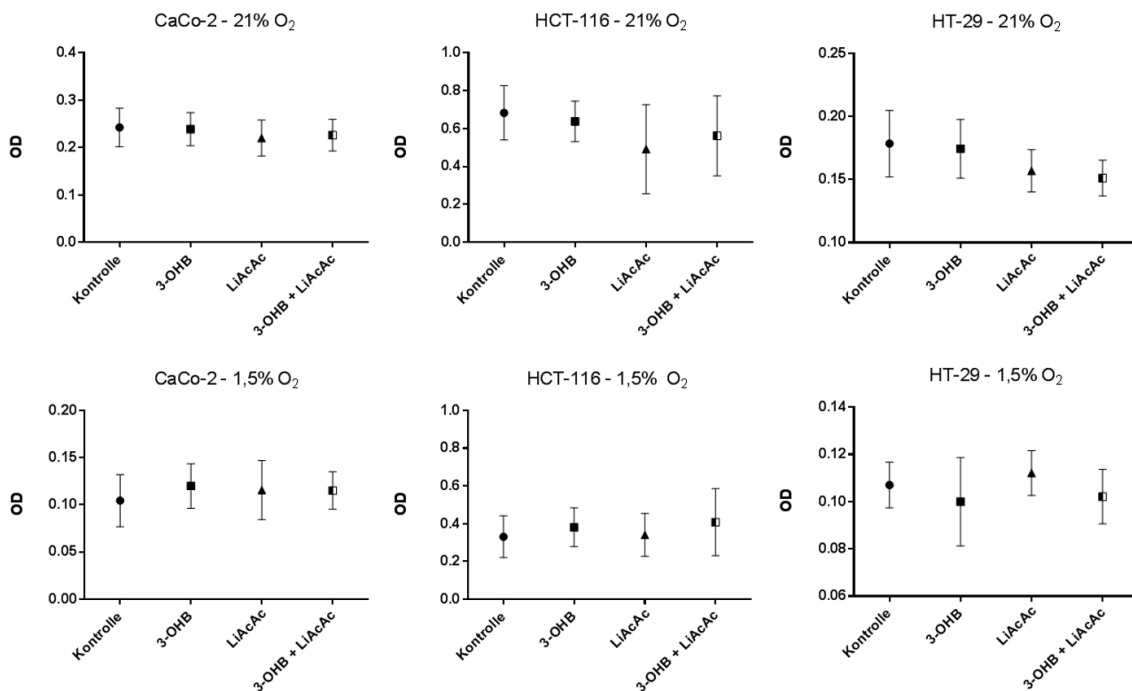


Abb. 14 - Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und 3-OHB + LiAcAc. Kristallviolett-Test. Die Vorkultivierung (s. 2.2.3.6) der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29 erfolgte unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) oder normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen. Mittelwert  $\pm$  SEM von je acht parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Keine der verwendeten Konditionen führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Trotz fehlender statistischer Signifikanz waren besonders bei HT-29 unter normoxischen Bedingungen dennoch Tendenzen entsprechend einer

verringerten Zellproliferation unter Zugabe von Ketonkörpern erkennbar. Diese Beobachtung stimmte mit den Ergebnissen des WST-8-Tests überein.

### 3.5 Strahlensensibilität der Zelllinien

Um zu untersuchen, wie sensibel die Tumorzelllinien auf ionisierende Strahlen reagieren, wurden die Zellen am zweiten Tag der Kultivierung in den 96-well Platten einmalig mit 2, 4, 6 oder 8 Gy behandelt. Je ein Ansatz wurde nicht bestrahlt (0 Gy). Nach vier Tagen Kultivierung wurde der Anteil der lebenden Zellen mit Hilfe der Zellvitalitätsassays (Mittelwert der optischen Dichte  $\pm$  SEM) bestimmt. In einem weiteren Schritt wurde die submaximale Strahlendosis von 2 Gy genauer beobachtet. Hierfür waren vor der Strahlenbehandlung die Konditionen Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und LiCl hergestellt worden. LiCl wurde verwendet, um einen möglichen Einfluss des Lithiums in dem Salz LiAcAc auf die Strahlensensibilität kontrollieren zu können. Die Zellvitalität wurde erneut nach vier Tagen Kultivierung mittels WST-8- und Kristallviolett-Test bestimmt.

#### 3.5.1 Bestrahlungskurven

Zum Vergleich der zytotoxischen Wirkung der unterschiedlichen Strahlenbehandlungen wurden die Ergebnisse des WST-8- und des Kristallviolett-Tests gegen die Strahlendosen aufgetragen und in Abb. 15 und 16 graphisch in Kurven dargestellt.

Insgesamt stellte sich HCT-116 als besonders strahlensensibel im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Zelllinien dar. Außerdem scheint eine submaximale Strahlendosis von 2 Gy insgesamt einen überproportional starken Effekt auf die Zellproliferation der Zelllinien zu haben.

### 3.5.1.1 WST-8-Test

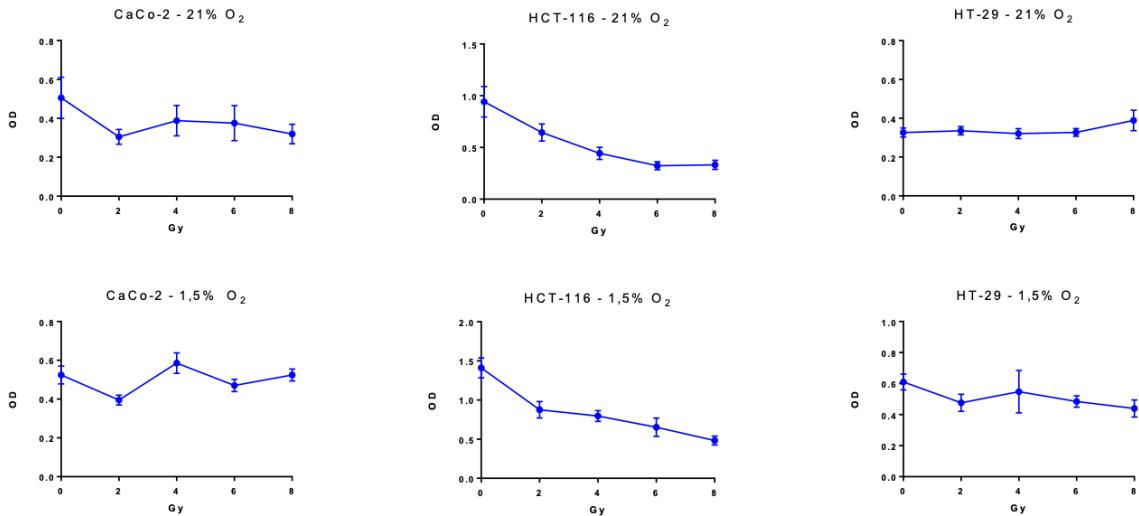


Abb. 15 - Strahlensensibilität der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29. Bestrahlungskurven nach WST-8-Test. Die Graphen zeigen die photometrisch gemessenen Werte der OD nach durchgeführtem WST-8-Test. Die Zellen wurden unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) oder normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen vorkultiviert. Am zweiten Tag der Kultivierung wurden die Zellen folgenden unterschiedlichen Strahlendosen ausgesetzt: 0, 2, 4, 6 und 8 Gy. Die Messung der OD erfolgte eine (21 % O<sub>2</sub>) bzw. zwei (1,5 % O<sub>2</sub>) Stunden nach Hinzufügen des WST-8 Reagenzes. Mittelwert  $\pm$  SEM von je acht parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes. OD = optische Dichte. Gy = Gray.

#### CaCo-2

Die Proliferation der Zellen blieb durch die Strahlenbehandlung weitgehend unbeeinträchtigt. Bei einer Strahlendosis von 2 Gy war sowohl bei 21 % ( $0,30 \pm 0,037$ ,  $p < 0,01$ ) als auch bei 1,5 % ( $0,40 \pm 0,009$ ,  $p < 0,001$ ) ein deutlicher Abfall der lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (21 %:  $0,51 \pm 0,037$ ; 1,5 %:  $0,52 \pm 0,016$ ) erkennbar. Bei höheren Strahlendosen hingegen war der zytotoxische Effekt der Strahlenbehandlung deutlich geringer ausgeprägt.

#### HCT-116

Ein deutlicher Effekt der Strahlenbehandlung war erkennbar. Mit zunehmender Strahlendosis wurden weniger lebende Zellen durch den WST-8-Test erfasst. Diese Beobachtung konnte sowohl bei normoxischen als auch bei hypoxischen Kultivierungsbedingungen gemacht werden.

## HT-29

Unter normoxischen Bedingungen zeigte die Strahlenbehandlung im WST-8-Test, unabhängig von der verwendeten Strahlendosis, keine Wirkung auf die Kurzzeit-Zellproliferation. Unter hypoxischen Bedingungen scheinen die Zelllinien leicht strahlensensibler zu sein. Im Vergleich zu einer fehlenden Strahlenbehandlung ( $0,61 \pm 0,018$ ) zeigte sich bei einer Behandlung mit 2 Gy ( $0,48 \pm 0,020$ ,  $p < 0,01$ ) ein deutlicher Abfall der erfassten Zellen. Weitere Erhöhung der Strahlendosis führte danach nur noch zu geringfügigen Veränderungen.

### 3.5.1.2 Kristallviolett-Test

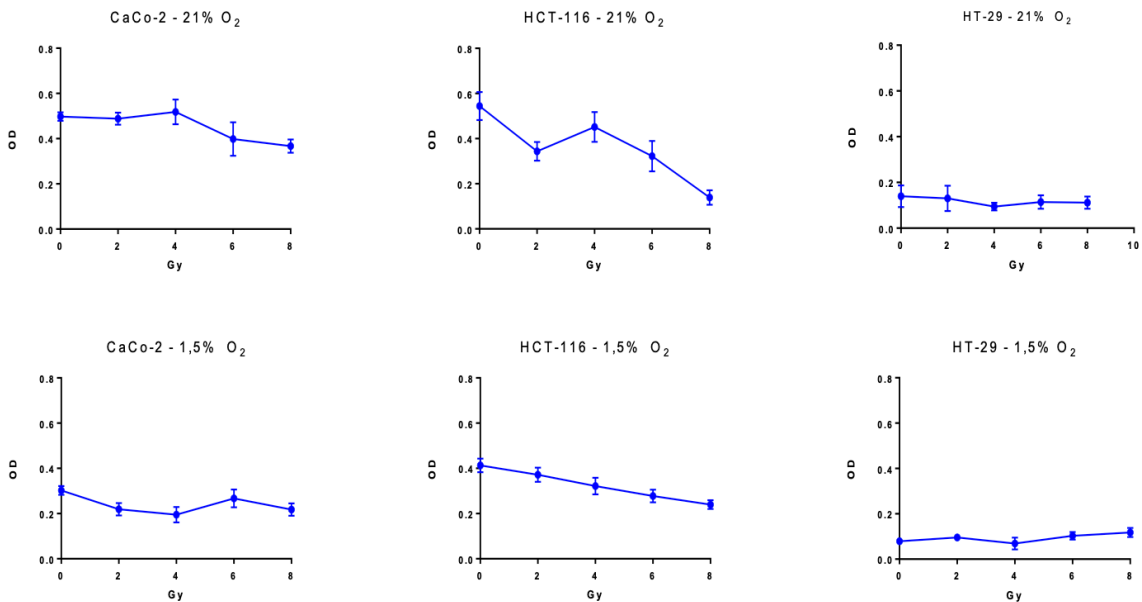


Abb. 16 - Strahlensensibilität der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29. Bestrahlungskurven nach Kristallviolett-Test. Die Graphen zeigen die photometrisch gemessenen Werte der OD nach durchgeführtem Kristallviolett-Test. Die Zellen wurden zuvor unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) und normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen vorkultiviert. Am zweiten Tag der Kultivierung wurden die Zellen folgenden unterschiedlichen Strahlendosen ausgesetzt: 0, 2, 4, 6 und 8 Gy. Mittelwert  $\pm$  SEM von je acht parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes.

## CaCo-2

Die Kurzzeitproliferation blieb durch die Strahlenbehandlung weitgehend unbeeinflusst. Generell war eine deutliche Verminderung der haftenden Zellen erst bei höheren Strahlendosen zu erkennen.



## HCT-116

Wie schon beim WST-8-Test konnte auch hier die Strahlensensibilität von HCT-116 nachgewiesen werden. Nach einer Strahlenbehandlung mit 8 Gy konnten kaum noch haftende Zellen erfasst werden. Überraschenderweise war auch hier ein besonders starker Effekt der Strahlendosis von 2 Gy erkennbar. Unter normoxischen Verhältnissen scheinen 2 Gy ( $0,3438 \pm 0,015$ ,  $p < 0,01$ ) sogar stärker zytotoxisch als eine höhere Strahlendosis von 4 Gy ( $0,45 \pm 0,023$ ) zu wirken. Unter 1,5 % Sauerstoff zeigte sich parallel zum WST-8-Test ein allmählicher Abfall der erfassten Zellzahl bei zunehmender Strahlendosis.

## HT-29

Parallel zum WST-8-Test war auch hier erkennbar, dass HT-29, gemessen an der Kurzzeit-Proliferation, am wenigsten sensibel auf die Strahlenbehandlung reagierte. Auch höhere Strahlendosen hatten kaum Einfluss auf die Zellproliferation.

### **3.5.2 Strahlendosis von 2 Gy**

Eine submaximale Strahlendosis von 2 Gy stellte sich als besonders effektiv heraus, die Zellproliferation der getesteten Zelllinien negativ zu beeinflussen. Daher soll im Folgenden der Einfluss der unterschiedlichen Konditionen auf die Zellen, welche mit 2 Gy behandelt wurden, genauer untersucht werden.

### 3.5.2.1 WST-8-Test

Die Ergebnisse der kolorimetrischen Bestimmung der lebenden Zellen für die Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29 sind in Abb. 17 dargestellt.

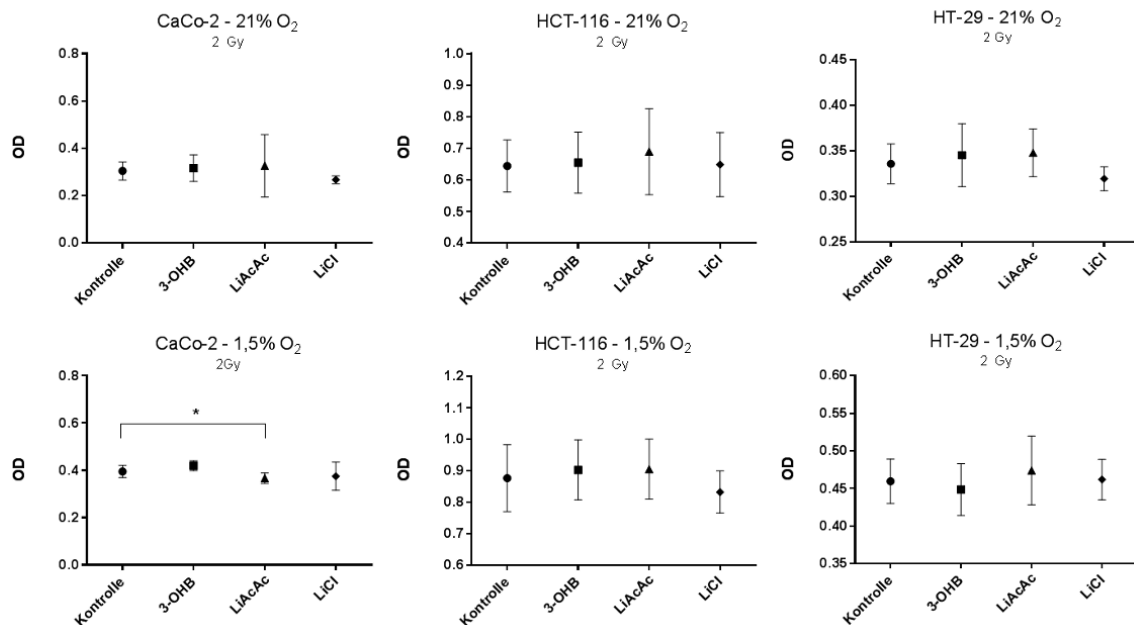


Abb. 17 - Effekt der Ketonkörper auf die Kurzzeit-Proliferation bei einer Strahlendosis von 2 Gy. WST-8-Test. Die abgebildeten Grafiken zeigen die Zellvitalität anhand OD nach Vorkultivierung (s. 2.2.3.6) unter den Konditionen Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und LiCl. Die Vorkultivierung erfolgte unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) oder normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen. Am zweiten Tag der Kultivierung wurden die Zellen einer Strahlendosis von 2 Gy ausgesetzt. Die Messung der OD erfolgte eine (21 % O<sub>2</sub>) bzw. zwei (1,5 % O<sub>2</sub>) Stunden nach Hinzufügen des WST-8 Reagenzes. Mittelwert  $\pm$  SEM von je acht parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Bei Vorkultivierung unter normoxischen Sauerstoffbedingungen wurde die Zellproliferation von CaCo-2 von keiner beigefügten Substanz entscheidend beeinflusst. Unter hypoxischen Bedingungen jedoch wurde die Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle ( $0,40 \pm 0,009$ ) signifikant durch die Zugabe von LiAcAc gehemmt ( $0,37 \pm 0,008$ ,  $p < 0,05$ ).

Auf die Zellvitalität von HCT-116 und HT-29 hatten die getesteten Konditionen bei einer Strahlendosis von 2 Gy keinen signifikanten Einfluss.

### 3.5.2.2 Kristallviolett-Test

Die Ergebnisse des Kristallviolett-Tests sind in Abb. 18 zusammengefasst.

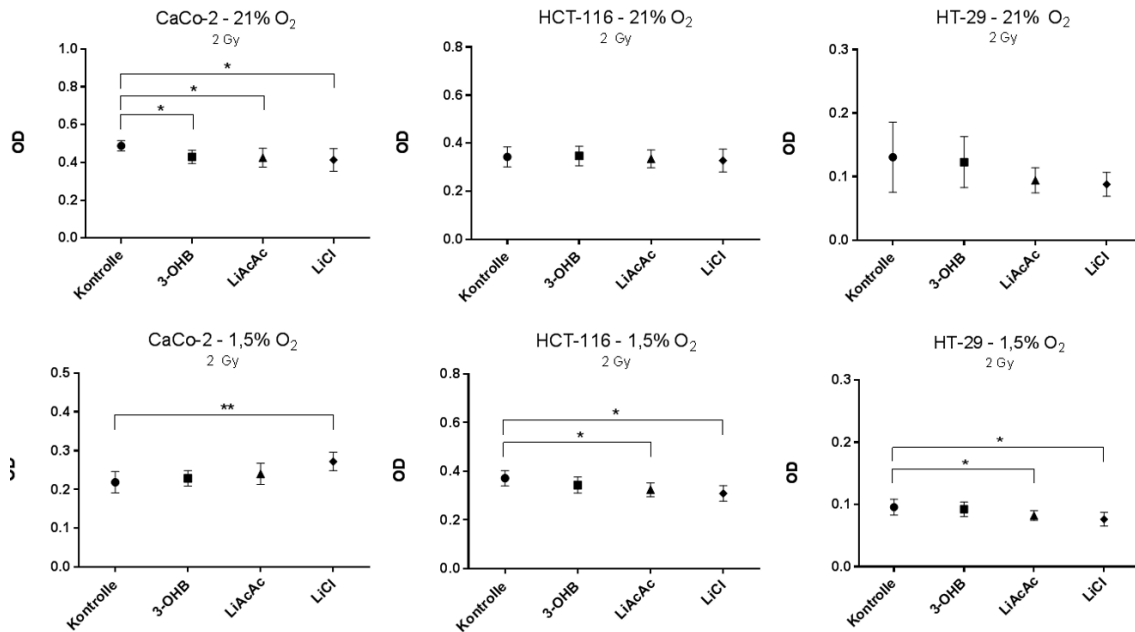


Abb. 18 - Effekt der Ketonkörper auf die Kurzzeit-Proliferation bei einer Strahlendosis von 2 Gy. Kristallviolett-Test. Die abgebildeten Grafiken zeigen die Zellvitalität anhand OD nach Vorkultivierung (s. 2.2.3.6) unter den Konditionen Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und LiCl. Die Vorkultivierung erfolgte unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) oder normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) Bedingungen. Am zweiten Tag der Kultivierung wurden die Zellen einer Strahlendosis von 2 Gy ausgesetzt. Mittelwert  $\pm$  SEM von je acht parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### CaCo-2

Unter 21 % Sauerstoff verringerten die Konditionen 3-OHB ( $0,43 \pm 0,012$ ,  $p < 0,05$ ), LiAcAc ( $0,43 \pm 0,012$ ,  $p < 0,05$ ) und LiCl ( $0,41 \pm 0,021$ ,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $0,49 \pm 0,009$ ) die, mit dem Kristallviolett-Test erfasste, Zellzahl signifikant. Zwischen LiAcAc und LiCl gab es keine signifikanten Unterschiede.

Unter 1,5 % Sauerstoff führte die Zugabe von LiCl ( $0,27 \pm 0,008$ ,  $p < 0,01$ ) vergleichend zur Kontrolle ( $0,22 \pm 0,01$ ) zu einer signifikanten Zunahme der Zellproliferation. Konträr zu den anderen Ergebnissen scheint LiCl den Zellen bei 2 Gy also sogar einen leichten Wachstumsvorteil zu verschaffen. Eine genaue Beurteilung der Ergebnisse fällt auf Grund sehr niedriger Werte der optischen Dichte schwer.

## HCT-116

Nur unter hypoxischen Bedingungen zeigten sich Unterschiede bezüglich der Zellzahl von HCT-116. LiAcAc ( $0,32 \pm 0,010$ ,  $p < 0,05$ ) und LiCl ( $0,31 \pm 0,011$ ,  $p < 0,01$ ) reduzierten die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle ( $0,37 \pm 0,011$ ) signifikant. Zwischen LiAcAc und LiCl traten keine signifikanten Unterschiede auf.

## HT-29

Bei HT-29 ergaben sich ebenfalls unter sauerstoffreichen Bedingungen keine Unterschiede zwischen den Konditionen. Wie bei HCT-116 trat bei Zugabe von LiAcAc ( $0,08 \pm 0,003$ ,  $p < 0,05$ ) und LiCl ( $0,08 \pm 0,004$ ,  $p < 0,05$ ) unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu Kontrolle ( $0,10 \pm 0,005$ ) auf. Die gemessenen Werte der optischen Dichte waren sehr gering, was einen genaueren Vergleich der einzelnen Konditionen erschwerte.

## 3.6 Colony-Forming-Assay (Koloniebildungs-Test)

Um die Langzeit-Proliferation bzw. die Koloniebildungsfähigkeit der verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurden Colony-Forming-Assays (CFA) wie in 2.2.4.3 beschrieben durchgeführt. Am zweiten Tag der Kultivierung wurden die Zellen in den 48-well Platten mit ionisierender Strahlung behandelt. Die Zellen wurden hierbei einer Strahlendosis von 2, 4, 6 oder 8 Gy ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, welche nicht bestrahlt (0 Gy) worden waren.

### 3.6.1 Koloniebildung unter normoxischen Bedingungen

Unter 21 % Sauerstoff verlief die Koloniebildung der einzelnen Zelllinien sehr ungleichmäßig. In einigen wells wuchsen die Kolonien überproportional dicht, in anderen waren kaum Kolonien erkennbar. Diese Beobachtung scheint unabhängig von den hergestellten Konditionen. Abb. 19 zeigt zum Vergleich zwei eingescannte CFAs. In a) sind Kolonien dargestellt, welche bei 21 % Sauerstoff inkubiert wurden, in b) solche, die sich unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) Bedingungen entwickelten.

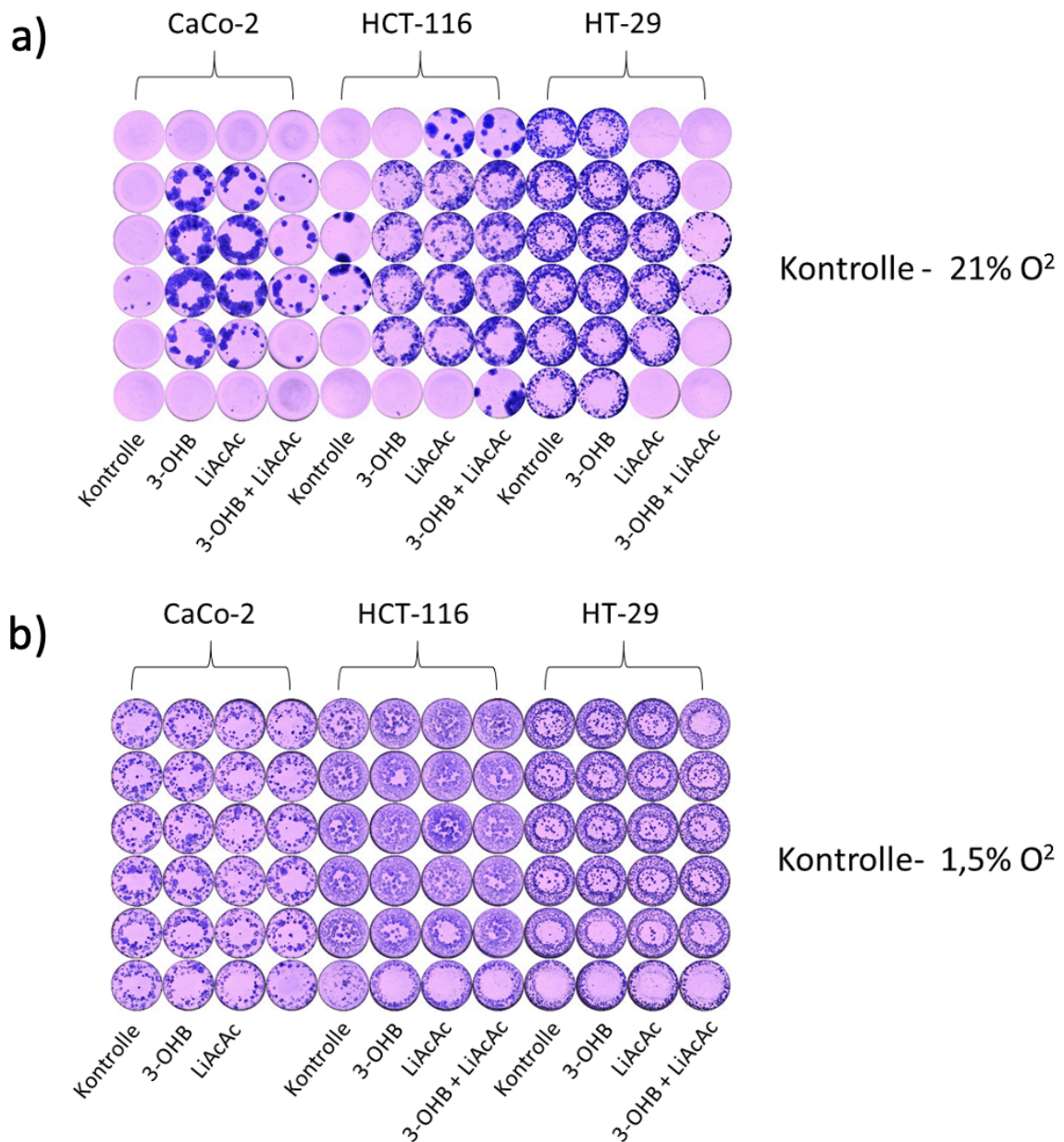


Abb. 19 - Koloniebildung ohne Strahlenbehandlung unter a) normoxischen und unter b) hypoxischen Bedingungen. Eingescannte CFA-Ansätze nach Kristallviolett-Test. Die Kultivierung (s. 2.2.4.3) erfolgte unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) und normoxischen (21 % O<sub>2</sub>). Dabei wurden folgende Konditionen hergestellt: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und eine Kombination aus 3-OHB und LiAcAc. Am zweiten Tag der Kultivierung wurden die Zellen mit folgenden unterschiedlichen Strahlendosen behandelt: 2, 4, 6, und 8 Gy. Je ein Kontrollansatz wurde nicht bestrahlt (0 Gy, hier dargestellt). Gezeigt ist je ein CFA-Ansatz von jeweils zwei unabhängigen Versuchen.

Generell scheint die maximale Koloniedichte nicht abhängig von einem hohen Sauerstoffgehalt zu sein. Die Kolonien zeigten unter Hypoxie ein gleichmäßiges, dichtes

Wachstum. Im Gegensatz dazu bildeten sich die Kolonien unter 21 % Sauerstoff stark unterschiedlich aus. In einigen wells scheint es, als habe der hohe Sauerstoffgehalt die Ausbildung der Kolonien sogar negativ beeinflusst. Die normoxischen Kolonien unterschieden sich sowohl innerhalb der Zelllinien als auch innerhalb der Konditionen, was eine vergleichende Beurteilung kaum möglich macht. Nachfolgend werden daher nur noch jene Ansätze betrachtet, welche bei 1,5 % Sauerstoff inkubiert wurden.

### 3.6.2 Wirkung ionisierender Strahlung auf die Koloniebildung

Um den Einfluss einer Strahlenbehandlung auf die Ausbildung von Kolonien der jeweiligen Zelllinien begutachten zu können, wurden die Zellen mit unterschiedlicher Energiedosis behandelt (0, 2, 4, 6, 8 Gy). Die Koloniebildung wurde graphisch mit dem ImageJ Plug-In „Colony Area“ ausgewertet und ist als prozentualer Anteil der Fläche eines wells angegeben. Abb. 20 vergleicht die Fähigkeit zur Koloniebildung der drei Zelllinien in Abhängigkeit zur ausgesetzten Strahlendosis.

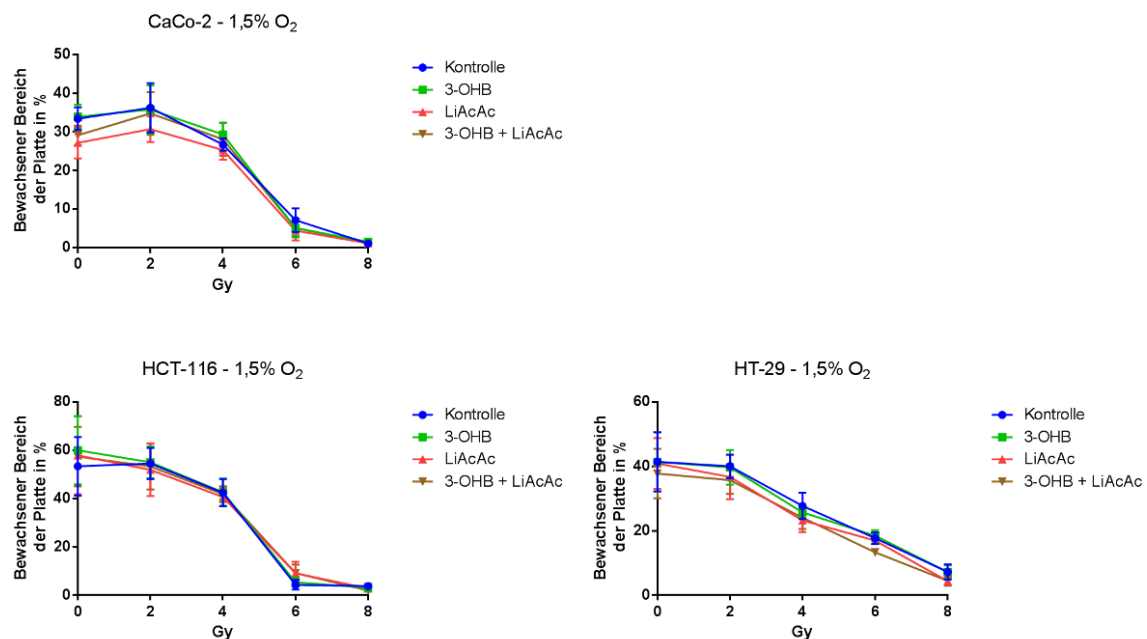


Abb. 20 - Koloniebildung in Abhängigkeit zur ausgesetzten Strahlendosis. Prozentuale Auswertung der Koloniebildung (Bewachsener Bereich der Platte in %) durch das ImageJ Plug-In „Colony Area“. Die Graphen stellen die Koloniebildungsfähigkeit unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) Bedingungen nach Strahlenbehandlung mit 0, 2, 4, 6 und 8 Gy dar. Darüber hinaus werden folgende Konditionen verglichen): Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und einer Kombination aus 3-OHB und LiAcAc. Mittelwert ± SEM von je sechs parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes.

Im Gegensatz zu der geringen unmittelbaren Wirkung, die eine Strahlenbehandlung auf die Kurzzeit-Zellproliferation von CaCo-2 und HT-29 hatte (s. 3.5.1), wurde die

Koloniebildung aller drei Zelllinien nachhaltig durch ionisierende Strahlen beeinträchtigt. Mit zunehmender Strahlendosis nahm die ermittelte Koloniedichte ab. Ab einer Dosis von 6 Gy waren kaum noch Kolonien der Zelllinien CaCo-2 und HCT-116 detektierbar. Ein möglicher Einfluss der hergestellten Konditionen auf die Koloniebildung und auf die Strahlensensibilität der Zelllinien bei einer Strahlendosis von 2 Gy wurde anschließend genauer untersucht.

### 3.6.3 Einfluss der Ketonkörper auf die Koloniebildung bei 2 Gy

In Abb. 21 ist makroskopisch kein Einfluss der zugefügten Lösungen auf die Koloniedichte erkennbar.

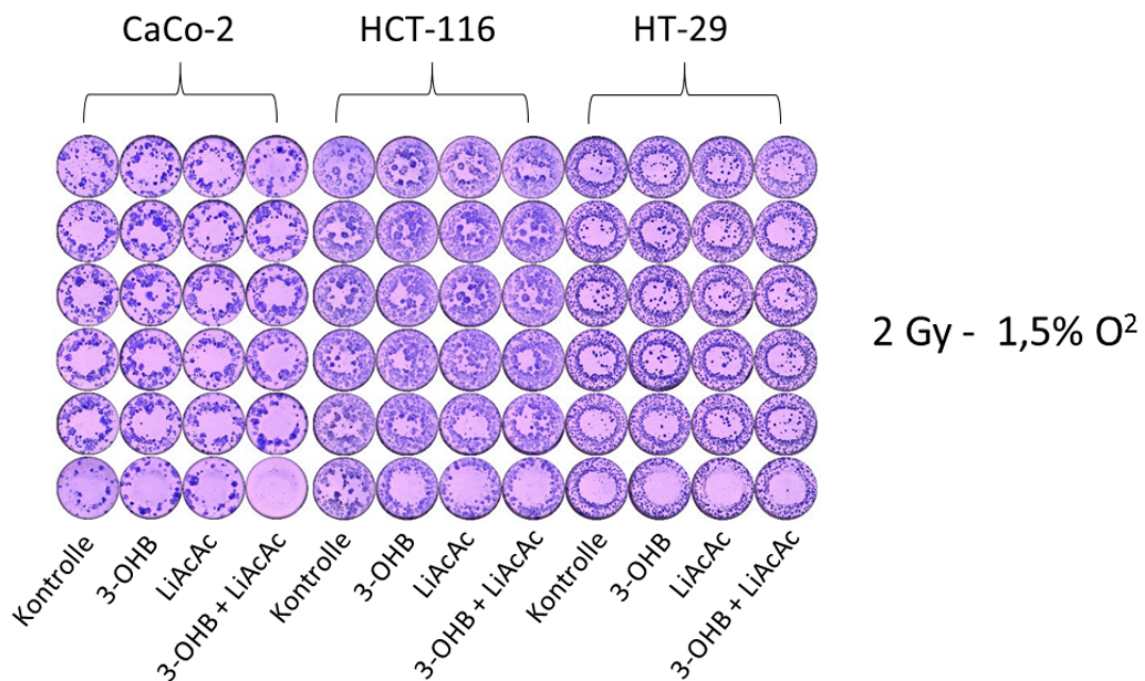


Abb. 21 - Koloniebildung unter hypoxischen Verhältnissen nach Strahlenbehandlung mit 2 Gy. Eingesannter CFA-Ansatz nach Kristallviolett-Test. Die Kultivierung (s. 2.2.4.3) erfolgte unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) Bedingungen). Dabei wurden folgende Konditionen hergestellt: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und eine Kombination aus 3-OHB und LiAcAc. Am zweiten Tag der Kultivierung wurden die Zellen einmalig mit einer Strahlendosis von 2 Gy behandelt. Gezeigt ist ein CFA-Ansatz von zwei unabhängigen Versuchen.

Neben vereinzelten Schwankungen der Koloniegrößen einiger wells zeigte sich durch die Zugabe von Ketonkörper keine wesentliche Ab- oder Zunahme der Kolonien. Auch nach graphischer Auswertung der Koloniegrößen (s. Abb. 22) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen. Jedoch waren

innerhalb der Zelllinien leichte Trends entsprechend einer Reduktion der Kolonien bei Zugabe von Ketonkörpern zu beobachten.

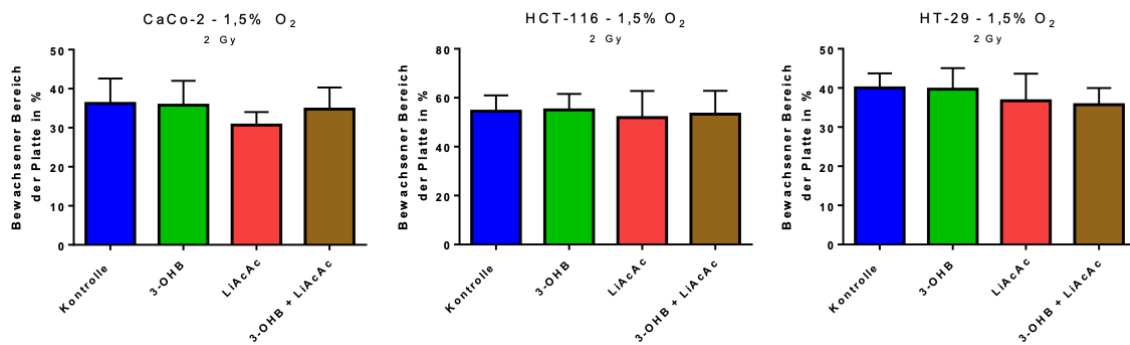


Abb. 22 - Koloniebildung unter hypoxischen Verhältnissen nach Strahlenbehandlung mit 2 Gy. Prozentuale Auswertung der Koloniebildung (Bewachsener Bereich der Platte in %) durch das ImageJ Plug-In „Colony Area“. Die Vorkultivierung (s. 2.2.4.3) der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29 erfolgte unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) Bedingungen. Dabei wurden folgende Konditionen hergestellt: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und eine Kombination aus 3-OHB und LiAcAc. Am zweiten Tag der Kultivierung wurden die Zellen einmalig mit einer Strahlendosis von 2 Gy behandelt. Mittelwert  $\pm$  SEM von je sechs parallelen Tests innerhalb eines Versuchsansatzes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



Um diese Trends genauer untersuchen zu können wurden die Ergebnisse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten CFAs zusammengetragen (s. Abb. 23), indem der Mittelwert der Kontrollgruppen jeweils auf 100 % normiert wurde. Die Koloniebildung für die Konditionen LiAcAc, 3-OHB und 3-OHB + LiAcAc wird hier als prozentualer Anteil des Mittelwerts der Kontrollgruppe angegeben.

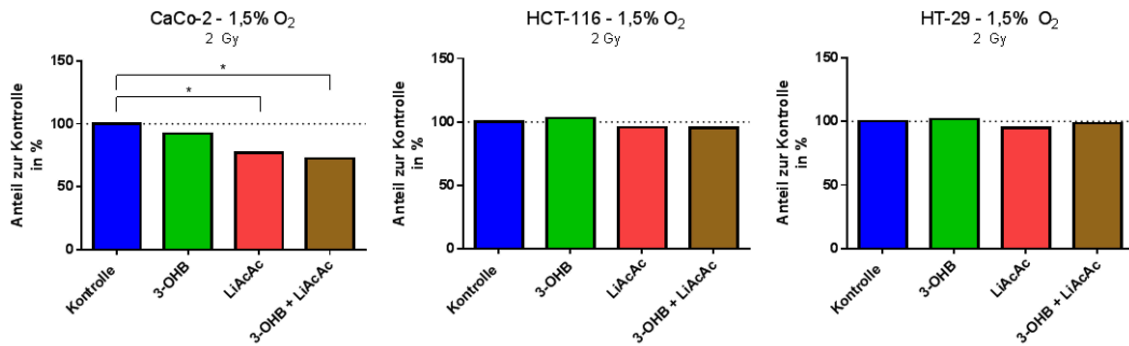


Abb. 23 - Zusammentragung der Ergebnisse von zwei unabhängigen CFAs mit jeweils 6 parallelen Tests. Koloniebildung unter hypoxischen Verhältnissen nach Strahlenbehandlung mit 2 Gy. Für die abgebildeten Grafiken wurden die Daten von zwei unabhängig voneinander durchgeführten CFAs zusammengeführt und der Mittelwert der Kontrollgruppe auf 100% normiert. Die Mittelwerte der anderen Gruppen werden als prozentualer Anteil des Mittelwerts der jeweiligen Kontrollgruppe angegeben. Verglichen wird die Koloniebildung unter hypoxischen (1,5 % O<sub>2</sub>) Bedingungen nach einer Strahlenbehandlung mit 2 Gy zwischen folgenden Konditionen: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und einer Kombination aus 3-OHB und LiAcAc. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Durch die gemeinsame Betrachtung der Colony-Forming-Assays in Abb. 23 fallen bei der Zelllinie CaCo-2 signifikante Unterschiede auf. Durch Zugabe von LiAcAc ( $p < 0,05$ ) und durch Zugabe von 3-OHB zusammen mit LiAcAc ( $p < 0,05$ ) fand eine signifikante Reduktion der Koloniedichte statt. Für die Zelllinien HCT-116 und HT-29 bleiben weiterhin nur leichte Trends zu erkennen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Bedeutung der Hypoxie für die durchgeführten Versuche

Der Sauerstoffpartialdruck im Tumor ist deutlich geringer als im entsprechenden gesunden Gewebe (Carreau et al., 2011; Höckel & Vaupel, 2001). Um die Konditionen im Organismus bestmöglich *in vitro* reproduzieren und wissenschaftlich relevante Daten erhalten zu können, war eine Betrachtung der Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen daher entscheidend.

### 4.2 Proteinexpressionsanalysen

#### 4.2.1 Expression von p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 wurde in allen getesteten Zellen unterschiedlich stark exprimiert.

In den CaCo-2 Zellen konnte erwartungsgemäß p53 nicht nachgewiesen werden, was (neben dem Zertifikat) als Bestätigung der „Echtheit“ der Zellen diene. Durch eine Punktmutation in Codon 204 entsteht ein Stopcodon, welches die vollständige Translation der DNA-Sequenz und damit die Synthese von p53 verhindert (Djelloul et al., 1997; Y. Liu & Bodmer, 2006). In diesen Zellen kann p53 also folglich nicht als Transkriptionsfaktor fungieren.

In den HCT-116 Zellen hingegen ist TP53 nicht mutiert und wird normal exprimiert (Y. Liu & Bodmer, 2006). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von p53 mittels Western Blot nachgewiesen werden.

Eine Überexpression von p53 konnte bei Untersuchung der HT-29 Zellen beobachtet werden. Eine solche Überexpression des mutierten Genprodukts führe zu einer Inaktivierung der p53 Funktion (Saintigny et al., 1999). Auvinen et al. fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer Überexpression von p53 in Kolonkarzinomen und einem reduzierten Überleben (Auvinen et al., 1994).

Die Ketonkörper hatten keinen messbaren Einfluss auf die Expression von p53. In den CaCo-2 Zellen blieb p53 auch unter Zugabe der Ketonkörper nicht nachweisbar. Darüber hinaus bewirkten die Ketonkörper in den Zelllinien HCT-116 und HT-29 offenbar keine verstärkte bzw. verminderte Expression des Tumorsuppressors. Auch in der Literatur sind solche Effekte bislang noch nicht beschrieben worden. Kun Liu et al. konnten in

ihrer Arbeit jedoch nachweisen, dass der Ketonkörper 3-OHB offenbar in der Lage ist, die Aktivität von p53 über  $\beta$ -Hydroxybutylierung zu verändern. Diese posttranslationale Modifikation verringere die antiproliferative und die proapoptotische Wirkung von p53 (K. Liu et al., 2019). Ein solcher Effekt von 3-OHB ist in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zu erkennen. Die Proliferation der HCT-116 Zellen, in welchen das p53-Gen nicht mutiert ist, wurde durch die Zugabe von 3-OHB nicht verstärkt.

#### **4.2.2 Expression von p21**

Die Expression von p21 in den CaCo-2 und HT-29 Zellen war nur sehr schwach ausgeprägt. Dies passt zu der Annahme, dass die Expression von p21 größtenteils durch stabilisiertes p53, welches als Transkriptionsfaktor die Transkription des p21-Gens CDKN1A stimuliert, induziert wird (Alberts et al., 2017). Trotzdem kann p21 in geringem Maß in diesen Zellen nachgewiesen werden. Roninson und Datto et al. beschreiben in ihren Arbeiten, dass eine Aktivierung von p21 über extrazelluläre Signalwege auch ohne Stimulation durch p53 erfolgen könne. Das Zytokin TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta) beispielsweise stimuliere die hemmende Wirkung von p21 auf den Zellzyklus unabhängig von p53 (Datto et al., 1995; Roninson, 2002). Dies könnte erklären, wieso p21 auch in den beiden Zelllinien ohne intaktes p53 exprimiert werden konnte. Allerdings wird in der Literatur erwähnt, dass ein Mangel an intaktem p53 onkogene Funktionen von p21 begünstigen könnte (Georgakilas et al., 2017). Ob p21 in den CaCo-2 und HT-29 Zellen (p53 defizient) onkogen wirkt, konnte nicht festgestellt werden.

Um weitere Aussagen bezüglich einer möglichen onkogenen Aktivität von p21 treffen zu können, hätte ebenfalls die zelluläre Verteilung des Proteins untersucht werden können, was im Rahmen dieser Dissertation leider nicht erfolgen konnte.

#### **4.2.3 Expression von p27**

Eine Expression von p27 konnte in allen Zellen gleichermaßen festgestellt werden und steht in Einklang mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (Afrin et al., 2018; Phang et al., 2017). Eine Zugabe der Ketonkörper 3-OHB und LiAcAc hatte keine erkennbaren Auswirkungen. Auch hier hätte eine Untersuchung, ob p27 vermehrt im Zellkern oder Zytoplasma vorkommt, weiteren Aufschluss über die Funktionen geben können. Darüber hinaus hätten eine quantitative Proteinanalyse oder eine quantitative Bestimmung der mRNA-Expression möglicherweise einen Einfluss der Ketonkörper offenlegen können.

#### **4.2.4 Ladekontrolle mit Lamin B1**

Bei der Analyse der Expression von Lamin B1 fielen die Banden innerhalb der jeweiligen Zelllinien teilweise ungleichmäßig stark aus. Um Fehler im Analyseverfahren auszuschließen, wurde eine zusätzliche Ladekontrolle mit  $\beta$ -Actin durchgeführt. Die Expression von  $\beta$ -Actin fiel erwartungsgerecht gleichmäßig aus. Folglich könnte der Einfluss der jeweiligen Konditionen eine veränderte Lamin B1 Expression bewirkt haben. Freund et al. fanden in ihrer Arbeit eine Assoziation zwischen einer verminderten Expression von Lamin B1 und zellulärer Seneszenz (Freund et al., 2012). Auch Radspieler et al. trafen in ihrer Arbeit ähnliche Schlussfolgerungen. Diese Forschungsgruppe konnte darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen einer verminderten Expression von Lamin B1 und einem schlechteren outcome bei klarzelligem Nierenzellkarzinom feststellen (Radspieler et al., 2019). Ein Einfluss der Ketonkörper auf die Lamin B1 Expression und damit eventuell auch auf die maximale Teilungsfähigkeit der Zellen ist unter dieser Annahme nicht auszuschließen.

### **4.3 Genexpressionsanalysen**

#### **4.3.1 Expression von MCT-1 und MCT-4**

Die Genexpression für die Monocarboxylat-Transporter 1 und 4 konnte in allen drei Zelllinien nachgewiesen werden. Demnach sind CaCo-2, HCT-116 und HT-29 prinzipiell in der Lage, Ketonkörper durch die Zellmembran zu transportieren. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, dass die beobachteten Effekte (bzw. deren Ausbleiben) nicht durch eine verhinderte Aufnahme der Ketonkörper in die Zellen bedingt waren. In anderen Arbeiten konnte unter Hypoxie eine Regulation im Sinne einer vermehrten Expression der Monocarboxylat-Transporter 1 und 4 beobachtet werden. Diese Ergebnisse seien assoziiert mit einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 (Miranda-Goncalves et al., 2016; Perez de Heredia et al., 2010). Obwohl in genannten Arbeiten Glioblastomzellen bzw. Adipozyten untersucht wurden, wäre ein ähnlicher Effekt für die hier getesteten Zelllinien denkbar und kann ohne quantitative Analysen, die jedoch den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würden, nicht ausgeschlossen werden.

Auch anderen Forschungsgruppen gelang der Nachweis von MCT-1 und -4 in den Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29 auf Protein- bzw. Genebene (Grotius et al., 2009; Hadjiagapiou et al., 2000; R. Li et al., 2013).

### **4.3.2 Expression von GPR41, -43 und 109A**

Der PCR-Nachweis der G-Protein gekoppelten Rezeptoren für 3-OHB war in allen Versuchen erfolgreich. Die Ketonkörper können demzufolge in allen drei Karzinomzelllinien ihre rezeptorvermittelte Wirkung entfalten.

In unterschiedlichen Arbeiten konnten hemmende Wirkungen von GPR43 und -109A in Mäusen bezüglich chronischer Inflammation und Tumorentstehung im Dickdarm nachgewiesen werden (M. Kim et al., 2018; Singh et al., 2014). Eine rezeptorvermittelte protektive Wirkung der Ketonkörper auf die Kolonkarzinomzelllinien könnte daher durchaus möglich sein. Entsprechend dazu stellten Al Mahri et al. in ihrer Arbeit eine verminderte Expression von GPR43 bei Patientinnen und Patienten mit Kolonkarzinom fest. In einem fortführenden Versuch konnten sie ebenfalls zeigen, dass ein Gen-Knockout der Gene für GPR41 und -43 in Zellen der Zelllinie HCT-116 zu signifikant erhöhten Proliferationsraten der Karzinomzellen führte (Al Mahri et al., 2020). In der hier vorliegenden Arbeit traten unter Zugabe der Ketonkörper als Substrate für die G-Protein gekoppelten Rezeptoren keine allgemeine Veränderung der Proliferation der Tumorzelllinien auf. Ein Knockout der Gene für GPR41, -43 und 109A wäre auch hier zur genaueren Beurteilung der Rezeptorfunktion interessant gewesen, hätte allerdings den Rahmen der Arbeit gesprengt.

## **4.4 Wirkung von Lithium innerhalb des Lithiumsalzes LiAcAc auf die Proliferation der Kolonkarzinomzellen**

Eine störende Einflussnahme von potenziell zelltoxischem Lithium (Li) zu vergleichbaren Konzentrationen wie innerhalb des Lithiumsalzes LiAcAc auf die Zellproliferation konnte in den hier durchgeführten Versuchen nicht gezeigt werden und wurde daher nach zusätzlich vergleichenden Versuchen mit NaAcAc vernachlässigt. In der Literatur wird dieses Thema allerdings kontrovers diskutiert (Bartmann et al., 2018; Cohen-Harazi et al., 2020; Franklin et al., 1991; Vidali et al., 2019), weshalb Lithium nicht gänzlich als Störfaktor ausgeschlossen werden sollte, auch wenn in dieser Arbeit keine Hinweise dafür zu sehen waren.

#### 4.5 Wirkung von 3-OHB und AcAc auf die Kurzzeit-Proliferation der Kolonkarzinomzellen

Allgemein waren durch die Zugabe der Ketonkörper kaum signifikante Unterschiede bezüglich der Proliferation der jeweiligen Zelllinien aufgetreten. Lediglich bei HT-29 verringerte sich die Zellproliferation durch die Zugabe von 3-OHB zusammen mit LiAcAc signifikant. Diese signifikanten Veränderungen traten dabei sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Sauerstoffbedingungen auf, waren jedoch lediglich unter Betrachtung der Proliferation nach Durchführung des WST-8-Tests festzustellen. Bei den anderen Zelllinien und im Kristallviolett-Test zeichneten sich zwar leichte Trends besonders unter gleichzeitiger Behandlung mit beiden Ketonkörpern ab, die Werte blieben jedoch ohne Signifikanz. Ähnlich zu den hier aufgeführten Ergebnissen konnten auch Bartmann et al. in ihren Versuchen an unterschiedlichen Brustkrebszelllinien keine signifikante Veränderung der Proliferation unter Zugabe von 3-OHB oder LiAcAc feststellen. Dabei seien jedoch unter Zugabe von 3-OHB ebenfalls leichte Tendenzen im Sinne einer verringerten Proliferation zu erkennen gewesen (Bartmann et al., 2018).

Eine Zunahme der Proliferationsrate unter 3-OHB wie in den Versuchen von Shakerly et al., die SW480 Kolonkarzinomzellen *in vitro* unter Zugabe von 3-OHB in Endkonzentrationen zwischen 0,1 und 5 mM untersuchten (Shakerly et al., 2018), zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in keinem der durchgeführten Versuche.

Eine Abnahme der Zellvitalität von HT-29-Zellen, die sowohl mit 3-OHB als auch mit LiAcAc behandelt wurden, ist in der Literatur bislang noch nicht beschrieben und sollte daher weiter untersucht werden. Dass diese Unterschiede nur im WST-8- und nicht im Kristallviolett-Test ein Signifikanzniveau erreichten, könnte in der unterschiedlichen Methodik der beiden Tests begründet sein. Während der WST-8-Test Aussage über die Aktivität von zellulären Dehydrogenasen als Maß für die Aktivität lebender Zellen gibt (Chamchoy et al., 2019), und damit adhärente und in Suspension befindliche Zellen erfasst, werden mit dem Kristallviolett-Test nur diejenigen lebenden Zellen, welche aktiv an der Zellkulturplatte haften können, gemessen (Feoktistova et al., 2016).

#### 4.6 Wirkung ionisierender Strahlung auf die Kurzzeit- und Langzeit-Proliferation der Kolonkarzinomzellen

Eine gewisse Resistenz der Zelllinien CaCo-2 und HT-29 gegenüber einer Strahlenbehandlung wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Babini et al.,

2018; Huerta et al., 2010; Yadollahpour et al., 2018). In der Arbeit von Babini et al. beispielsweise konnten 48 Stunden nach der Behandlung von CaCo-2 Zellen mit 2, 5 und 10 Gy keine signifikanten Veränderungen der Zellproliferation im Vergleich zu Kontrollgruppe (0 Gy) festgestellt werden. Der Anteil toter Zellen, welcher durch eine Trypanblau-Färbung ermittelt wurde, war jedoch nach 48 Stunden mit zunehmender Strahlendosis bereits signifikant erhöht (Babini et al., 2018). Diese Beobachtungen könnten mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit im Einklang stehen. Während auch hohe Strahlendosen keinen Einfluss auf die Kurzzeit-Proliferation hatten, wurde die Koloniebildung und damit die Langzeitproliferation von CaCo-2 und HT-29 durch höhere Strahlendosen zunehmend beeinträchtigt. Möglicherweise können die beiden Zelllinien ihre metabolische Aktivität über einen gewissen Zeitraum nach Bestrahlung noch aufrechterhalten, wodurch die Ergebnisse der Kurzzeit-Proliferation unauffällig bleiben. Da sowohl CaCo-2 als auch HT-29 Zellen Mutationen für p53 aufweisen, wäre ein Zusammenhang zwischen einer p53-Mutation und einer zunehmenden Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung durchaus denkbar. Huerta et al. konnten diesen Verdacht in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2013 erhärten, indem sie HCT-116 Wildtyp-Zellen mit HCT-116 Zellen, in denen das Gen für p53 inaktiviert worden war ( $p53^{-/-}$ ), vergleichend untersuchten. Die  $p53^{-/-}$  Zellen zeigten dabei eine signifikant erhöhte Strahlenresistenz (Huerta et al., 2013). Ähnliche Beobachtungen für andere Tumorentitäten wurden in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Böhnke et al., 2004; Maebayashi et al., 1999; Okaichi et al., 2008; Shiomitsu et al., 2008).

Eine allgemeine Abnahme der Strahlenempfindlichkeit unter Hypoxie, wie teilweise in der Literatur beschrieben (Horsman & Overgaard, 2016; Wilson & Hay, 2011), konnte in den hier durchgeführten Versuchen nicht zwingend bestätigt werden. Lediglich die Ergebnisse des Kristallviolett-Tests deuten auf eine zunehmende Strahlenresistenz der HCT-116 Zellen unter Hypoxie hin. Unterschiede zu den Ergebnissen des WST-8-Tests sind vermutlich wieder in der abweichenden Testmethodik begründet.

Oft reagierten die Zellen auf eine Strahlendosis von 2 Gy besonders empfindlich, so dass in vielen Versuchen die Kurzzeit-Proliferation nach Bestrahlung mit 2 Gy sogar stärker vermindert als nach Bestrahlung mit einer höheren Dosis von 4 Gy war. Andere Forschungsgruppen untersuchten ebenfalls die Wirkung ionisierender Strahlung auf die gleichen Zelllinien. In keiner dieser Arbeiten wurde ein solcher Effekt von 2 Gy weder für CaCo-2 (de Carvalho et al., 2006; Morini et al., 2017) noch für HCT-116 (Huerta et al., 2013; Wang et al., 2018) oder HT-29 (Huerta et al., 2013; Jia et al., 2016) beschrieben. Es wäre daher interessant, in fortführenden Versuchen die Wirkung unterschiedlicher

Strahlendosen auf die Kolonkarzinomzellen genauer zu untersuchen. Um mögliche Fehler zu vermeiden, wurden die Zellkulturplatten stets einzeln, unter gleichen Bedingungen und mit demselben Linearbeschleuniger bestrahlt.

#### 4.7 Wirkung von 3-OHB und AcAc auf die Strahlensensibilität der Zellen bei einer Strahlendosis von 2 Gy

Bei Betrachtung der beiden CFAs fällt auf, dass CaCo-2 Zellen unter dem Einfluss von LiAcAc und unter Zugabe von 3-OHB zusammen mit LiAcAc vermeintlich stärker auf eine Strahlenexposition von 2 Gy reagierten. Eine Wirkung des Lithiums innerhalb des Lithiumsalzes LiAcAc sollte auch bzgl. der Strahlensensibilität nicht gänzlich ausgeschlossen werden. In den Tests der Kurzzeit-Proliferation nach Bestrahlung, in denen LiCl als Kontrolle verwendet worden war, zeigten sich meist ähnlich starke Effekte durch LiAcAc und LiCl auf die Zellvitalität nach Bestrahlung. Diese Ergebnisse lassen einen Einfluss des Lithiums auf die Strahlenempfindlichkeit vermuten und decken sich mit den Beobachtungen von Rouhani et al., die in ihrer Arbeit die Wirkung von LiCl auf Brustkrebszellen der Linie T47D untersucht hatten. Die Behandlung von LiCl allein hatte bei der Forschungsgruppe bis zu Konzentrationen von 50 mM keine Auswirkungen auf die Zellvitalität. In Kombination mit ionisierender Strahlung konnten nach Vorbehandlung mit LiCl jedoch signifikante Unterschiede im Sinne einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit registriert werden. Allerdings wurden die Zellen zuvor mit LiCl in einer Endkonzentration von 20 mM behandelt, was einem Vielfachen der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration entspricht (Rouhani et al., 2014). Dennoch sollte auch bei der Interpretation der hier vorliegenden Ergebnisse ein möglicher Einfluss des Lithiums nicht vernachlässigt werden. Weitere Versuche mit NaAcAc wären durchaus sinnvoll, um die Konsequenz einer Behandlung mit AcAc isoliert beurteilen zu können.

3-OHB scheint die Strahlenempfindlichkeit der Kolonkarzinom-Zelllinien nicht zu beeinflussen. Lediglich bei Betrachtung der Kurzzeit-Proliferation von CaCo-2 unter 21 % Sauerstoff reagierten die Zellen nach 3-OHB-Behandlung signifikant empfindlicher auf eine Strahlenbehandlung mit 2 Gy. Umgekehrt zeigte sich aber auch in keinem der hier durchgeführten Versuche eine Zunahme der Strahlenresistenz. Aktuell gibt es in der Literatur wenige Daten, die auf eine Radiosensibilisierung durch die Ketonkörper 3-OHB oder AcAc hinweisen. Auch Bartmann et al. konnten keine signifikanten Veränderungen der Strahlenempfindlichkeit nach 3-OHB Behandlung verschiedener Brustkrebs Zelllinien beobachten (Bartmann et al., 2018). In einer *in vivo*-Studie berichten Zahra et



al. dagegen von einer signifikanten Verlängerung des Überlebens von Mäusen unter ketogener Diät bei gleichzeitiger Bestrahlung nach xenogener Transplantation von Pankreastumorzellen (Zahra et al., 2017). Eine Wirkung der Ketonkörper 3-OHB und AcAc auf die Strahlenempfindlichkeit sollte daher nicht gänzlich ausgeschlossen und weiter untersucht werden. Zudem kann ein lebender Organismus nicht gänzlich mit einer isolierten Zellkultur verglichen werden. Es könnten *in vivo* zahlreiche weitere Mechanismen zum Tragen kommen, welche in isolierten Zellkulturen nicht untersucht werden können.

Wichtig für den Einsatz als supportives Therapiekonzept ist außerdem die Sicherheit und die Verträglichkeit der ketogenen Diät unter Radiotherapie. Champ et al. 2014 konnten in ihrer klinischen Studie eine sehr gute Verträglichkeit der ketogenen Diät in Kombination mit einer Radiochemotherapie bei Patientinnen und Patienten mit Glioblastom nachweisen (Champ et al., 2014). In der klinischen Studie von Klement et al. tolerierten Patientinnen mit Brustkrebs die ketogene Diät unter Radiotherapie ebenfalls gut. Außerdem konnten signifikante Änderungen der Körperzusammensetzung, welche als prognostischer Faktor für Tumorerkrankungen herangezogen werden kann, festgestellt werden. Eine signifikante Verminderung des Körperfettanteils und eine leichte Gewichtsreduktion unter ketogener Diät im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden beobachtet (Klement et al., 2020). Im Hinblick auf die Ergebnisse anderer Studien und die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit erscheint die ketogene Diät prinzipiell als sichere und durchführbare supportive Therapiemaßnahme während einer Radiotherapie. Weitere Arbeiten, welche explizit das klinische outcome einer Strahlenbehandlung unter ketogener Diät bei Tumorerkrankungen untersuchen, bleiben abzuwarten.

## 5 Zusammenfassung

Die ketogene Diät besitzt ein breites mögliches therapeutisches Spektrum und aufgrund der induzierten Ketonkörper in der Theorie auch antiproliferative sowie antiinflammatorische Wirkmechanismen. Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung der Ketonkörper  $\beta$ -Hydroxybutyrat und Acetoacetat auf Kolonkarzinomzellen *in vitro* zu untersuchen. Hierfür wurden Proliferation, Koloniebildung, Gen- und Proteinexpression von drei verschiedenen Zelllinien analysiert. Um einen möglichen Zusammenhang der Ketonkörperwirkung und dem p53-Status zu prüfen, wurden Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Status eingesetzt. Etwaige Effekte der Ketonkörper auf die Strahlensensibilität der Zellen wurden ebenfalls untersucht. Um möglichst tumorphysiologische Bedingungen herzustellen, wurden die Versuche nicht nur unter normoxischen Bedingungen (21 % Sauerstoff), sondern parallel unter 1,5 % Sauerstoffkonzentration durchgeführt. In den Tests zur Proteinexpression konnte festgestellt werden, dass die Expression von p53 nicht durch die Zugabe von Ketonkörpern beeinflusst wird. Die Proteinexpression von p21 und p27 war unabhängig von der Expression von p53. Die Analyse der Genexpression beweist, dass die untersuchten Zelllinien sowohl die Monocarboxylattransporter (MCTs) exprimieren, über welche die Ketonkörper aufgenommen werden können, als auch die G-Proteingekoppelten Rezeptoren, über welche die Ketonkörper auf die Signalketten wirken können. Ein hemmender Einfluss der Ketonkörper auf die Zellproliferation ließ sich im WST-8-Test für die Zelllinie HT-29 unter Zugabe von 3-OHB in Kombination mit LiAcAc nachweisen. Nach Strahlenbehandlung stellten sich die Zelllinien CaCo-2 und HT-29 bei Betrachtung der Kurzzeitproliferation weitgehend strahlenresistent dar. Bei Untersuchung der Langzeitproliferation mittels Koloniebildungstest zeigte sich jedoch auch hier eine zytotoxische Wirkung der ionisierenden Strahlung. Für die Zelllinie CaCo2 konnte zudem durch Zugabe von LiAcAc allein und in Kombination mit 3-OHB eine signifikante Reduktion der Koloniebildung nach Bestrahlung mit 2 Gy festgestellt werden. Zusammenfassend weisen die durchgeführten Versuche darauf hin, dass die Ketonkörper unabhängig vom p53-Status in alle untersuchten Kolonkarzinomzellen aufgenommen und verwertet werden können. Ein allgemein synergistischer Effekt zwischen ionisierender Strahlung und den Ketonkörpern konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Zugabe der Ketonkörper führte weder zu einer Proliferationsanregung noch zur Reduktion der Strahlensensitivität, so dass hier von einer klinischen Unbedenklichkeit ausgegangen werden kann. Fortführende klinische Studien sind notwendig, um die *in vivo* Effekte zu untersuchen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer*, 9(6), 400-414. doi:10.1038/nrc2657
- Abbastabar, M., Kheyrollah, M., Azizian, K., Bagherlou, N., Tehrani, S. S., Maniati, M., & Karimian, A. (2018). Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst)*, 69, 63-72. doi:10.1016/j.dnarep.2018.07.008
- Afrin, S., Giampieri, F., Gasparri, M., Forbes-Hernández, T. Y., Cianciosi, D., Reboredo-Rodríguez, P., Amici, A., Quiles, J. L., & Battino, M. (2018). The inhibitory effect of Manuka honey on human colon cancer HCT-116 and LoVo cell growth. Part 1: the suppression of cell proliferation, promotion of apoptosis and arrest of the cell cycle. *Food Funct*, 9(4), 2145-2157. doi:10.1039/c8fo00164b
- Al Mahri, S., Al Ghamdi, A., Akiel, M., Al Aujan, M., Mohammad, S., & Aziz, M. A. (2020). Free fatty acids receptors 2 and 3 control cell proliferation by regulating cellular glucose uptake. *World J Gastrointest Oncol*, 12(5), 514-525. doi:10.4251/wjgo.v12.i5.514
- Alberts, B., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Schäfer, U., Johnson, A. D., & Horstmann, C. (2017). *Molekularbiologie der Zelle (6. Auflage)*. Weinheim: John Wiley & Sons, Incorporated.
- Ang, Z., & Ding, J. L. (2016). GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation - Protective or Causative? *Front Immunol*, 7, 28. doi:10.3389/fimmu.2016.00028
- Arastéh, K., Baenkler, H.-W., Bieber, C., Brandt, R., Chatterjee, T. T., Dill, T., Ditting, T., Duckert, M., Eich, W., Ernst, S., Fischer-Rasokat, U., Fischli, S., Fleck, R., Fritze, D., Fießl, H., Hahn, J.-M., Hamm, C., Harenberg, J., Hengstmann, J. H., Herzog, W., Hinkelbein, J., Hofmann, T., Holstege, A., Huck, K., Kähler, J., Keller, M., Kim, W.-K., Klingmüller, D., Knaevelsrud, I., Köster, R., Kuck, K.-H., Liebetrau, C., Löwe, B., Loßnitzer, N., Mann, W. A., Matzdorff, A., Müller-Tasch, T., Nienaber, C. A., Nikendei, C., Nürnberg, M., Pausch, J., Petzsch, M., Pfeifer, M., Rösch, W., Sauer, N., Schäfer, J., Scherbaum, H., Scheurich, C., Schlehofer, B., Schmidt, M., Schneider, H., Schöffauer, M., Schork, J., Schuchert, A., Schwab, M., Schweikert, H.-U., Spannagl, M., Stern, H., Stocker, H., Usadel, K.-H., Veelken, R., Voll, R. E., Wahl, P., Wißner, E., Zastrow, A., Zeuzem, S., Ziegler, R., & Zipfel, S. (2018). *Duale Reihe Innere Medizin (4. Auflage)*: Georg Thieme Verlag.
- Auvinen, A., Isola, J., Visakorpi, T., Koivula, T., Virtanen, S., & Hakama, M. (1994). Overexpression of p53 and long-term survival in colon carcinoma. *British Journal of Cancer*, 70(2), 293-296. doi:10.1038/bjc.1994.295

- Babini, G., Morini, J., Barbieri, S., Baiocco, G., Ivaldi, G. B., Liotta, M., Tabarelli de Fatis, P., & Ottolenghi, A. (2018). A Co-culture Method to Investigate the Crosstalk Between X-ray Irradiated Caco-2 Cells and PBMC. *J Vis Exp*(131: 56908). doi:10.3791/56908
- Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J. K., Hamilton, S., & Vogelstein, B. (1990). p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 50(23), 7717-7722.
- Bardos, J. I., & Ashcroft, M. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays*, 26(3), 262-269. doi:10.1002/bies.20002
- Bartmann, C., Janaki Raman, S. R., Flöter, J., Schulze, A., Bahlke, K., Willingstorfer, J., Strunz, M., Wöckel, A., Klement, R. J., Kapp, M., Djuzenova, C. S., Otto, C., & Kämmerer, U. (2018). Beta-hydroxybutyrate (3-OHB) can influence the energetic phenotype of breast cancer cells, but does not impact their proliferation and the response to chemotherapy or radiation. *Cancer Metab*, 6, 8. doi:10.1186/s40170-018-0180-9
- Benyo, Z., Gille, A., Bennett, C. L., Clausen, B. E., & Offermanns, S. (2006). Nicotinic acid-induced flushing is mediated by activation of epidermal langerhans cells. *Mol Pharmacol*, 70(6), 1844-1849. doi:10.1124/mol.106.030833
- Benyo, Z., Gille, A., Kero, J., Csiky, M., Suchankova, M. C., Nusing, R. M., Moers, A., Pfeffer, K., & Offermanns, S. (2005). GPR109A (PUMA-G/HM74A) mediates nicotinic acid-induced flushing. *J Clin Invest*, 115(12), 3634-3640. doi:10.1172/jci23626
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2013). *Stryer Biochemie (7. Auflage)*. Heidelberg: Springer Spektrum Berlin, Heidelberg.
- Bertoli, C., Copetti, T., Lam, E. W., Demarchi, F., & Schneider, C. (2009). Calpain small-1 modulates Akt/FoxO3A signaling and apoptosis through PP2A. *Oncogene*, 28(5), 721-733. doi:10.1038/onc.2008.425
- Besson, A., Assoian, R. K., & Roberts, J. M. (2004). Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat Rev Cancer*, 4(12), 948-955. doi:10.1038/nrc1501
- Böhnke, A., Westphal, F., Schmidt, A., El-Awady, R. A., & Dahm-Daphi, J. (2004). Role of p53 mutations, protein function and DNA damage for the radiosensitivity of human tumour cells. *Int J Radiat Biol*, 80(1), 53-63. doi:10.1080/09553000310001642902
- Boison, D. (2017). New insights into the mechanisms of the ketogenic diet. *Curr Opin Neurol*, 30(2), 187-192. doi:10.1097/wco.0000000000000432

- Brenner, H., Schrotz-King, P., Holleczeck, B., Katalinic, A., & Hoffmeister, M. (2016). Rückgang der Inzidenz und Mortalität von Darmkrebs in Deutschland. *Dtsche Arztebl International*, 113(7), 101-106. doi:10.3238/arztebl.2016.0101
- Bröer, S., Bröer, A., Schneider, H. P., Stegen, C., Halestrap, A. P., & Deitmer, J. W. (1999). Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J*, 341 ( Pt 3), 529-535. doi:10.1042/0264-6021:3410529
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), 857-868. doi:10.1016/s0092-8674(00)80595-4
- Bueno, N. B., de Melo, I. S., de Oliveira, S. L., & da Rocha Ataíde, T. (2013). Very-low-carbohydrate ketogenic diet v. low-fat diet for long-term weight loss: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr*, 110(7), 1178-1187. doi:10.1017/s0007114513000548
- Cahill, G. F., Jr. (1970). Starvation in man. *N Engl J Med*, 282(12), 668-675. doi:10.1056/nejm197003192821209
- Cahill, G. F., Jr., & Veech, R. L. (2003). Ketoacids? Good medicine? *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 114, 149-163.
- Calderon, N., Betancourt, L., Hernandez, L., & Rada, P. (2017). A ketogenic diet modifies glutamate, gamma-aminobutyric acid and agmatine levels in the hippocampus of rats: A microdialysis study. *Neurosci Lett*, 642, 158-162. doi:10.1016/j.neulet.2017.02.014
- Calvayrac, O., Nowosad, A., Cabantous, S., Lin, L. P., Figarol, S., Jeannot, P., Serres, M. P., Callot, C., Perchey, R. T., Creff, J., Taranchon-Clermont, E., Rouquette, I., Favre, G., Pradines, A., Manenti, S., Mazieres, J., Lee, H., & Besson, A. (2019). Cytoplasmic p27(Kip1) promotes tumorigenesis via suppression of RhoB activity. *J Pathol*, 247(1), 60-71. doi:10.1002/path.5167
- Carpenter, L., & Halestrap, A. P. (1994). The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lettre tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF. *Biochem J*, 304 ( Pt 3), 751-760. doi:10.1042/bj3040751
- Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C., & Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*, 15(6), 1239-1253. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x

- Chamchoy, K., Pakotiprapha, D., Pumirat, P., Leartsakulpanich, U., & Boonyuen, U. (2019). Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochem*, *20*(1), 4. doi:10.1186/s12858-019-0108-1
- Champ, C. E., Palmer, J. D., Volek, J. S., Werner-Wasik, M., Andrews, D. W., Evans, J. J., Glass, J., Kim, L., & Shi, W. (2014). Targeting metabolism with a ketogenic diet during the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*, *117*(1), 125-131. doi:10.1007/s11060-014-1362-0
- Chang, B. D., Watanabe, K., Broude, E. V., Fang, J., Poole, J. C., Kalinichenko, T. V., & Roninson, I. B. (2000). Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(8), 4291-4296. doi:10.1073/pnas.97.8.4291
- Chiche, J., Brahimi-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med*, *14*(4), 771-794. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x
- Child, E. S., & Mann, D. J. (2006). The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle*, *5*(12), 1313-1319. doi:10.4161/cc.5.12.2863
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., & Pavletich, N. P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, *265*(5170), 346-355. doi:10.1126/science.8023157
- Chu, I. M., Hengst, L., & Slingerland, J. M. (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, *8*(4), 253-267. doi:10.1038/nrc2347
- Cmielová, J., & Rezáčová, M. (2011). p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [corrected]. *J Cell Biochem*, *112*(12), 3502-3506. doi:10.1002/jcb.23296
- Cohen-Harazi, R., Hofmann, S., Kogan, V., Fulman-Levy, H., Abaev, K., Shovman, O., Brider, T., & Koman, I. (2020). Cytotoxicity of Exogenous Acetoacetate in Lithium Salt Form Is Mediated by Lithium and Not Acetoacetate. *Anticancer Res*, *40*(7), 3831-3837. doi:10.21873/anticancer.14372
- Dabek, A., Wojtala, M., Pirola, L., & Balcerzyk, A. (2020). Modulation of Cellular Biochemistry, Epigenetics and Metabolomics by Ketone Bodies. Implications of the Ketogenic Diet in the Physiology of the Organism and Pathological States. *Nutrients*, *12*(3), 788. doi:10.3390/nu12030788

- Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., & Wang, X. F. (1995). Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5545-5549. doi:10.1073/pnas.92.12.5545
- Day, D. W., & Morson, B. C. (1978). The adenoma-carcinoma sequence. *Major Probl Pathol*, 10, 58-71.
- de Carvalho, A. D., de Souza, W., & Morgado-Díaz, J. A. (2006). Morphological and molecular alterations at the junctional complex in irradiated human colon adenocarcinoma cells, Caco-2. *Int J Radiat Biol*, 82(9), 658-668. doi:10.1080/09553000600930095
- Dellas, C. (2017). *Kurzlehrbuch Pharmakologie (2. Auflage)*. München: Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG.
- Denko, N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*, 8(9), 705-713. doi:10.1038/nrc2468
- Dienstmann, R., Salazar, R., & Tabernero, J. (2015). Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. *J Clin Oncol*, 33(16), 1787-1796. doi:10.1200/jco.2014.60.0213
- Dimmer, K. S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J. W., & Broer, S. (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J*, 350 Pt 1, 219-227. doi:10.1042/0264-6021:3500219
- Djelloul, S., Fogue-Lafitte, M.-E., Hermelin, B., Mareel, M., Bruyneel, E., Baldi, A., Giordano, A., Chastre, E., & Gespach, C. (1997). Enterocyte differentiation is compatible with SV40 large T expression and loss of p53 function in human colonic Caco-2 cells: Status of the pRb1 and pRb2 tumor suppressor gene products. *FEBS Letters*, 406(3), 234-242. doi:10.1016/S0014-5793(97)00208-1
- Dupaul-Chicoine, J., Yeretssian, G., Doiron, K., Bergstrom, K. S., McIntire, C. R., LeBlanc, P. M., Meunier, C., Turbide, C., Gros, P., Beauchemin, N., Vallance, B. A., & Saleh, M. (2010). Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity*, 32(3), 367-378. doi:10.1016/j.immuni.2010.02.012
- Epstein, T., Gatenby, R. A., & Brown, J. S. (2017). The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand. *PLoS One*, 12(9), e0185085. doi:10.1371/journal.pone.0185085
- Evans, M., Cogan, K. E., & Egan, B. (2017). Metabolism of ketone bodies during exercise and training: physiological basis for exogenous supplementation. *J Physiol*, 595(9), 2857-2871. doi:10.1113/JP273185

- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-i
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(4), 343-346. doi:10.1101/pdb.prot087379
- Fero, M. L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C. E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L. H., Broudy, V., Perlmutter, R. M., Kaushansky, K., & Roberts, J. M. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*, 85(5), 733-744. doi:10.1016/s0092-8674(00)81239-8
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., & Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57(7), 1083-1093. doi:10.1016/0092-8674(89)90045-7
- Franklin, S. T., Young, J. W., & Nonnecke, B. J. (1991). Effects of ketones, acetate, butyrate, and glucose on bovine lymphocyte proliferation. *J Dairy Sci*, 74(8), 2507-2514. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78428-2
- Freeman, J., Veggiotti, P., Lanzi, G., Tagliabue, A., & Perucca, E. (2006). The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects. *Epilepsy Res*, 68(2), 145-180. doi:10.1016/j.eplepsyres.2005.10.003
- Freeman, J. M., & Kossoff, E. H. (2010). Ketosis and the ketogenic diet, 2010: advances in treating epilepsy and other disorders. *Adv Pediatr*, 57(1), 315-329. doi:10.1016/j.yapd.2010.08.003
- Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell*, 23(11), 2066-2075. doi:10.1091/mbc.E11-10-0884
- Garcia-Echeverria, C., & Sellers, W. R. (2008). Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene*, 27(41), 5511-5526. doi:10.1038/onc.2008.246
- Ge, H., Li, X., Weiszmann, J., Wang, P., Baribault, H., Chen, J. L., Tian, H., & Li, Y. (2008). Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology*, 149(9), 4519-4526. doi:10.1210/en.2008-0059
- Georgakilas, A. G., Martin, O. A., & Bonner, W. M. (2017). p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med*, 23(4), 310-319. doi:10.1016/j.molmed.2017.02.001
- Gershuni, V. M., Yan, S. L., & Medici, V. (2018). Nutritional Ketosis for Weight Management and Reversal of Metabolic Syndrome. *Curr Nutr Rep*, 7(3), 97-106. doi:10.1007/s13668-018-0235-0



- Greco, T., Glenn, T. C., Hovda, D. A., & Prins, M. L. (2016). Ketogenic diet decreases oxidative stress and improves mitochondrial respiratory complex activity. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(9), 1603-1613. doi:10.1177/0271678x15610584
- Grotius, J., Dittfeld, C., Huether, M., Mueller-Klieser, W., Baumann, M., & Kunz-Schughart, L. A. (2009). Impact of exogenous lactate on survival and radioresponse of carcinoma cells in vitro. *Int J Radiat Biol*, 85(11), 989-1001. doi:10.3109/09553000903242156
- Hadjiagapiou, C., Schmidt, L., Dudeja, P. K., Layden, T. J., & Ramaswamy, K. (2000). Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279(4), G775-780. doi:10.1152/ajpgi.2000.279.4.G775
- Halestrap, A. P. (2013). The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 337-349. doi:10.1016/j.mam.2012.05.003
- Halestrap, A. P., & Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch*, 447(5), 619-628. doi:10.1007/s00424-003-1067-2
- Halestrap, A. P., & Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J*, 343 Pt 2, 281-299. doi:doi.org/10.1042/bj3430281
- Hartman, A. L., Gasior, M., Vining, E. P., & Rogawski, M. A. (2007). The neuropharmacology of the ketogenic diet. *Pediatr Neurol*, 36(5), 281-292. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2007.02.008
- He, Y., Lu, L., Wei, X., Jin, D., Qian, T., Yu, A., Sun, J., Cui, J., & Yang, Z. (2016). The multimerization and secretion of adiponectin are regulated by TNF-alpha. *Endocrine*, 51(3), 456-468. doi:10.1007/s12020-015-0741-4
- Herold, G. (2019). *Innere Medizin 2019*. Köln: Gerd Herold Verlag.
- Ho, W. C., Pikor, L., Gao, Y., Elliott, B. E., & Greer, P. A. (2012). Calpain 2 regulates Akt-FoxO-p27(Kip1) protein signaling pathway in mammary carcinoma. *J Biol Chem*, 287(19), 15458-15465. doi:10.1074/jbc.M112.349308
- Höckel, M., & Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, 93(4), 266-276. doi:10.1093/jnci/93.4.266
- Hohn, S., Dozieres-Puyravel, B., & Auvin, S. (2019). History of dietary treatment from Wilder's hypothesis to the first open studies in the 1920s. *Epilepsy Behav*, 101(Pt A), 106588. doi:10.1016/j.yebeh.2019.106588

- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, *253*(5015), 49-53. doi:10.1126/science.1905840
- Horsman, M. R., & Overgaard, J. (2016). The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy. *J Radiat Res*, *57 Suppl 1*(Suppl 1), i90-i98. doi:10.1093/jrr/rrw007
- Huang, H., Park, P. H., McMullen, M. R., & Nagy, L. E. (2008). Mechanisms for the anti-inflammatory effects of adiponectin in macrophages. *J Gastroenterol Hepatol*, *23 Suppl 1*, S50-53. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.05284.x
- Huang, X. F., & Chen, J. Z. (2009). Obesity, the PI3K/Akt signal pathway and colon cancer. *Obes Rev*, *10*(6), 610-616. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00607.x
- Huerta, S., Gao, X., Dineen, S., Kapur, P., Saha, D., & Meyer, J. (2013). Role of p53, Bax, p21, and DNA-PKcs in radiation sensitivity of HCT-116 cells and xenografts. *Surgery*, *154*(2), 143-151. doi:10.1016/j.surg.2013.03.012
- Huerta, S., Gao, X., Livingston, E. H., Kapur, P., Sun, H., & Anthony, T. (2010). In vitro and in vivo radiosensitization of colorectal cancer HT-29 cells by the smac mimetic JP-1201. *Surgery*, *148*(2), 346-353. doi:10.1016/j.surg.2010.05.006
- IARC. (2018). Red Meat and Processed Meat. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Vol. 114). Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer.
- Ibrahim-Hashim, A., & Estrella, V. (2019). Acidosis and cancer: from mechanism to neutralization. *Cancer Metastasis Rev*, *38*(1-2), 149-155. doi:10.1007/s10555-019-09787-4
- Janakiram, N. B., & Rao, C. V. (2014). The role of inflammation in colon cancer. *Adv Exp Med Biol*, *816*, 25-52. doi:10.1007/978-3-0348-0837-8\_2
- Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2044-2058. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.054
- Jia, Y., Dai, G., Wang, J., Gao, X., Zhao, Z., Duan, Z., Gu, B., Yang, W., Wu, J., Ju, Y., Wang, M., & Li, Z. (2016). c-MET inhibition enhances the response of the colorectal cancer cells to irradiation in vitro and in vivo. *Oncol Lett*, *11*(4), 2879-2885. doi:10.3892/ol.2016.4303
- Karimian, A., Ahmadi, Y., & Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, *42*, 63-71. doi:10.1016/j.dnarep.2016.04.008

- Kim, B. J., Jeong, J. H., Kim, J. H., Kim, H. S., & Jang, H. J. (2017). The role of targeted agents in the adjuvant treatment of colon cancer: a meta-analysis of randomized phase III studies and review. *Oncotarget*, *8*(19), 31112-31118. doi:10.18632/oncotarget.16091
- Kim, D. Y., Davis, L. M., Sullivan, P. G., Maalouf, M., Simeone, T. A., van Brederode, J., & Rho, J. M. (2007). Ketone bodies are protective against oxidative stress in neocortical neurons. *J Neurochem*, *101*(5), 1316-1326. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04483.x
- Kim, M., Friesen, L., Park, J., Kim, H. M., & Kim, C. H. (2018). Microbial metabolites, short-chain fatty acids, restrain tissue bacterial load, chronic inflammation, and associated cancer in the colon of mice. *Eur J Immunol*, *48*(7), 1235-1247. doi:10.1002/eji.201747122
- Kim, S., & An, S. S. (2016). Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine (Baltimore)*, *95*(26), e3993. doi:10.1097/md.0000000000003993
- Kimura, I., Inoue, D., Maeda, T., Hara, T., Ichimura, A., Miyauchi, S., Kobayashi, M., Hirasawa, A., & Tsujimoto, G. (2011). Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(19), 8030-8035. doi:10.1073/pnas.1016088108
- Klement, R. J., Champ, C. E., Kämmerer, U., Koebrunner, P. S., Krage, K., Schäfer, G., Weigel, M., & Sweeney, R. A. (2020). Impact of a ketogenic diet intervention during radiotherapy on body composition: III-final results of the KETOCOMP study for breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, *22*(1), 94. doi:10.1186/s13058-020-01331-5
- Kostylina, G., Simon, D., Fey, M. F., Yousefi, S., & Simon, H. U. (2008). Neutrophil apoptosis mediated by nicotinic acid receptors (GPR109A). *Cell Death Differ*, *15*(1), 134-142. doi:10.1038/sj.cdd.4402238
- Krebs, H. A. (1966). The regulation of the release of ketone bodies by the liver. *Adv Enzyme Regul*, *4*, 339-354. doi:10.1016/0065-2571(66)90027-6
- Krilanovich, N. J. (2007). Benefits of ketogenic diets. *Am J Clin Nutr*, *85*(1), 238-239; author reply 239-240. doi:10.1093/ajcn/85.1.238
- Kumari, S., Badana, A. K., G, M. M., G, S., & Malla, R. (2018). Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark Insights*, *13*, 1177271918755391. doi:10.1177/1177271918755391
- LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A., & Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*, *11*(7), 847-862. doi:10.1101/gad.11.7.847

- Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G. D., Mosconi, S., Mandala, M., Cervantes, A., & Arnold, D. (2013). Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, *24 Suppl 6*, 64-72. doi:10.1093/annonc/mdt354
- Laffel, L. (1999). Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, *15*(6), 412-426. doi:10.1002/(sici)1520-7560(199911/12)15:6<412::aid-dmrr72>3.0.co;2-8
- Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J. Y., Lannoy, V., Decobecq, M. E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Van Damme, J., Parmentier, M., & Detheux, M. (2003). Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem*, *278*(28), 25481-25489. doi:10.1074/jbc.M301403200
- Leslie, A., Carey, F. A., Pratt, N. R., & Steele, R. J. (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*, *89*(7), 845-860. doi:10.1046/j.1365-2168.2002.02120.x
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, *88*(3), 323-331. doi:10.1016/s0092-8674(00)81871-1
- Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*, *9*(10), 749-758. doi:10.1038/nrc2723
- Li, R., Pan, Y., He, B., Xu, Y., Gao, T., Song, G., Sun, H., Deng, Q., & Wang, S. (2013). Downregulation of CD147 expression by RNA interference inhibits HT29 cell proliferation, invasion and tumorigenicity in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, *43*(6), 1885-1894. doi:10.3892/ijo.2013.2108
- Li, S. K. H., & Martin, A. (2016). Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. *Trends Mol Med*, *22*(4), 274-289. doi:10.1016/j.molmed.2016.02.003
- Liu, K., Li, F., Sun, Q., Lin, N., Han, H., You, K., Tian, F., Mao, Z., Li, T., Tong, T., Geng, M., Zhao, Y., Gu, W., & Zhao, W. (2019). p53  $\beta$ -hydroxybutyrylation attenuates p53 activity. *Cell Death Dis*, *10*(3), 243. doi:10.1038/s41419-019-1463-y
- Liu, X., Sun, Y., Ehrlich, M., Lu, T., Kloog, Y., Weinberg, R. A., Lodish, H. F., & Henis, Y. I. (2000). Disruption of TGF-beta growth inhibition by oncogenic ras is linked to p27Kip1 mislocalization. *Oncogene*, *19*(51), 5926-5935. doi:10.1038/sj.onc.1203991
- Liu, Y., & Bodmer, W. F. (2006). Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(4), 976. doi:10.1073/pnas.0510146103

- Lukasova, M., Malaval, C., Gille, A., Kero, J., & Offermanns, S. (2011). Nicotinic acid inhibits progression of atherosclerosis in mice through its receptor GPR109A expressed by immune cells. *J Clin Invest*, *121*(3), 1163-1173. doi:10.1172/jci41651
- Macia, L., Tan, J., Vieira, A. T., Leach, K., Stanley, D., Luong, S., Maruya, M., Ian McKenzie, C., Hijikata, A., Wong, C., Binge, L., Thorburn, A. N., Chevalier, N., Ang, C., Marino, E., Robert, R., Offermanns, S., Teixeira, M. M., Moore, R. J., Flavell, R. A., Fagarasan, S., & Mackay, C. R. (2015). Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun*, *6*, 6734. doi:10.1038/ncomms7734
- Maebayashi, K., Mitsuhashi, N., Takahashi, T., Sakurai, H., & Niibe, H. (1999). p53 mutation decreased radiosensitivity in rat yolk sac tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, *44*(3), 677-682. doi:10.1016/s0360-3016(99)00025-5
- Magalhães, B., Peleteiro, B., & Lunet, N. (2012). Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*, *21*(1), 15-23. doi:10.1097/CEJ.0b013e3283472241
- Masino, S. A., & Ruskin, D. N. (2013). Ketogenic diets and pain. *J Child Neurol*, *28*(8), 993-1001. doi:10.1177/0883073813487595
- Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H. C., Rolph, M. S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R. J., Teixeira, M. M., & Mackay, C. R. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, *461*(7268), 1282-1286. doi:10.1038/nature08530
- Masui, R., Sasaki, M., Funaki, Y., Ogasawara, N., Mizuno, M., Iida, A., Izawa, S., Kondo, Y., Ito, Y., Tamura, Y., Yanamoto, K., Noda, H., Tanabe, A., Okaniwa, N., Yamaguchi, Y., Iwamoto, T., & Kasugai, K. (2013). G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells. *Inflamm Bowel Dis*, *19*(13), 2848-2856. doi:10.1097/01.MIB.0000435444.14860.ea
- McKeown, S. R. (2014). Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol*, *87*(1035), 20130676. doi:10.1259/bjr.20130676
- Miranda-Goncalves, V., Granja, S., Martinho, O., Honavar, M., Pojo, M., Costa, B. M., Pires, M. M., Pinheiro, C., Cordeiro, M., Bebiano, G., Costa, P., Reis, R. M., & Baltazar, F. (2016). Hypoxia-mediated upregulation of MCT1 expression supports the glycolytic phenotype of glioblastomas. *Oncotarget*, *7*(29), 46335-46353. doi:10.18632/oncotarget.10114

- Miyamoto, J., Ohue-Kitano, R., Mukouyama, H., Nishida, A., Watanabe, K., Igarashi, M., Irie, J., Tsujimoto, G., Satoh-Asahara, N., Itoh, H., & Kimura, I. (2019). Ketone body receptor GPR43 regulates lipid metabolism under ketogenic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(47), 23813-23821. doi:10.1073/pnas.1912573116
- Molina, A., Vendrell, J., Gutiérrez, C., Simón, I., Masdevall, C., Soler, J., & Gómez, J. M. (2003). Insulin resistance, leptin and TNF-alpha system in morbidly obese women after gastric bypass. *Obes Surg*, *13*(4), 615-621. doi:10.1381/096089203322190844
- Morini, J., Babini, G., Barbieri, S., Baiocco, G., & Ottolenghi, A. (2017). The Interplay between Radioresistant Caco-2 Cells and the Immune System Increases Epithelial Layer Permeability and Alters Signaling Protein Spectrum. *Front Immunol*, *8*, 223. doi:10.3389/fimmu.2017.00223
- Nakajima, A., Nakatani, A., Hasegawa, S., Irie, J., Ozawa, K., Tsujimoto, G., Suganami, T., Itoh, H., & Kimura, I. (2017). The short chain fatty acid receptor GPR43 regulates inflammatory signals in adipose tissue M2-type macrophages. *PLoS One*, *12*(7), e0179696. doi:10.1371/journal.pone.0179696
- O'Keefe, S. J. (2016). Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *13*(12), 691-706. doi:10.1038/nrgastro.2016.165
- Offermanns, S. (2006). The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci*, *27*(7), 384-390. doi:10.1016/j.tips.2006.05.008
- Offermanns, S. (2014). Free fatty acid (FFA) and hydroxy carboxylic acid (HCA) receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *54*, 407-434. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011613-135945
- Offermanns, S. (2017). Hydroxy-Carboxylic Acid Receptor Actions in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, *28*(3), 227-236. doi:10.1016/j.tem.2016.11.007
- Offermanns, S., Colletti, S. L., Lovenberg, T. W., Semple, G., Wise, A., & AP, I. J. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXII: Nomenclature and Classification of Hydroxy-carboxylic Acid Receptors (GPR81, GPR109A, and GPR109B). *Pharmacol Rev*, *63*(2), 269-290. doi:10.1124/pr.110.003301
- Okaichi, K., Ide-Kanematsu, M., Izumi, N., Morita, N., Okumura, Y., & Ihara, M. (2008). Variations in sensitivity to ionizing radiation in relation to p53 mutation point. *Anticancer Res*, *28*(5a), 2687-2690.
- Oren, M., & Rotter, V. (2010). Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *2*(2), a001107. doi:10.1101/cshperspect.a001107

- Park, M. S., Rosai, J., Nguyen, H. T., Capodieci, P., Cordon-Cardo, C., & Koff, A. (1999). p27 and Rb are on overlapping pathways suppressing tumorigenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(11), 6382-6387. doi:10.1073/pnas.96.11.6382
- Parveen, A., Akash, M. S., Rehman, K., & Kyunn, W. W. (2016). Dual Role of p21 in the Progression of Cancer and Its Treatment. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, *26*(1), 49-62. doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.v26.i1.60
- Peairs, A. T., & Rankin, J. W. (2008). Inflammatory response to a high-fat, low-carbohydrate weight loss diet: effect of antioxidants. *Obesity (Silver Spring)*, *16*(7), 1573-1578. doi:10.1038/oby.2008.252
- Peltomäki, P., & Vasen, H. (2004). Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers*, *20*(4-5), 269-276. doi:10.1155/2004/305058
- Perez de Heredia, F., Wood, I. S., & Trayhurn, P. (2010). Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. *Pflugers Arch*, *459*(3), 509-518. doi:10.1007/s00424-009-0750-3
- Phang, C. W., Karsani, S. A., & Abd Malek, S. N. (2017). Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Flavokawain C on HT-29 Human Colon Adenocarcinoma via Enhancement of Reactive Oxygen Species Generation, Upregulation of p21, p27, and GADD153, and Inactivation of Inhibitor of Apoptosis Proteins. *Pharmacogn Mag*, *13*(Suppl 2), 321-328. doi:10.4103/0973-1296.210180
- Phillips, A. H., Ou, L., Gay, A., Besson, A., & Kriwacki, R. W. (2018). Mapping Interactions between p27 and RhoA that Stimulate Cell Migration. *J Mol Biol*, *430*(6), 751-758. doi:10.1016/j.jmb.2018.01.017
- Phinney, S. D. (2004). Ketogenic diets and physical performance. *Nutr Metab (Lond)*, *1*(1), 2. doi:10.1186/1743-7075-1-2
- Piccolo, M. T., & Crispi, S. (2012). The Dual Role Played by p21 May Influence the Apoptotic or Anti-Apoptotic Fate in Cancer. *Journal of Cancer Research Updates*, *1*, 189-202. doi:10.6000/1929-2279.2012.01.02.5
- Pietrzyk, L., Torres, A., Maciejewski, R., & Torres, K. (2015). Obesity and Obese-related Chronic Low-grade Inflammation in Promotion of Colorectal Cancer Development. *Asian Pac J Cancer Prev*, *16*(10), 4161-4168. doi:10.7314/apjcp.2015.16.10.4161
- Pinto, A., Bonucci, A., Maggi, E., Corsi, M., & Businaro, R. (2018). Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Activity of Ketogenic Diet: New Perspectives for Neuroprotection in Alzheimer's Disease. *Antioxidants (Basel)*, *7*(5). doi:10.3390/antiox7050063

- Radspieler, M. M., Schindeldecker, M., Stenzel, P., Försch, S., Tagscherer, K. E., Herpel, E., Hohenfellner, M., Hatiboglu, G., Roth, W., & Macher-Goeppinger, S. (2019). Lamin-B1 is a senescence-associated biomarker in clear-cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett*, *18*(3), 2654-2660. doi:10.3892/ol.2019.10593
- Rassow, J., Netzker, R., Hauser, K., & Deutzmann, R. (2016). *Duale Reihe Biochemie (4. Auflage)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Reuter, B. K., & Pizarro, T. T. (2004). Commentary: the role of the IL-18 system and other members of the IL-1R/TLR superfamily in innate mucosal immunity and the pathogenesis of inflammatory bowel disease: friend or foe? *Eur J Immunol*, *34*(9), 2347-2355. doi:10.1002/eji.200425351
- Robert-Koch-Institut. (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018. 46-49. doi:10.25646/8353
- Roediger, W. E. (1982). Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology*, *83*(2), 424-429. doi:10.1016/S0016-5085(82)80339-9
- Roninson, I. B. (2002). Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett*, *179*(1), 1-14. doi:10.1016/s0304-3835(01)00847-3
- Rouhani, M., Goliaei, B., Khodaghali, F., & Nikoofar, A. (2014). Lithium increases radiosensitivity by abrogating DNA repair in breast cancer spheroid culture. *Arch Iran Med*, *17*(5), 352-360. doi:0141705/AIM.009
- Ruan, H. B., & Crawford, P. A. (2018). Ketone bodies as epigenetic modifiers. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *21*(4), 260-266. doi:10.1097/mco.0000000000000475
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, *4*(1), 177-197. doi:10.1002/cphy.c130024
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massagué, J., & Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, *382*(6589), 325-331. doi:10.1038/382325a0
- Saintigny, Y., Rouillard, D., Chaput, B., Soussi, T., & Lopez, B. S. (1999). Mutant p53 proteins stimulate spontaneous and radiation-induced intrachromosomal homologous recombination independently of the alteration of the transactivation activity and of the G1 checkpoint. *Oncogene*, *18*(24), 3553-3563. doi:10.1038/sj.onc.1202941
- Sampaio, L. P. (2016). Ketogenic diet for epilepsy treatment. *Arq Neuropsiquiatr*, *74*(10), 842-848. doi:10.1590/0004-282x20160116



- Schaub, A., Futterer, A., & Pfeffer, K. (2001). PUMA-G, an IFN-gamma-inducible gene in macrophages is a novel member of the seven transmembrane spanning receptor superfamily. *Eur J Immunol*, *31*(12), 3714-3725. doi:10.1002/1521-4141(200112)31:12<3714::aid-immu3714>3.0.co;2-1
- Serres, M. P., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Concha, C., Gurian-West, M., Daburon, V., Roberts, J. M., & Besson, A. (2011). Cytoplasmic p27 is oncogenic and cooperates with Ras both in vivo and in vitro. *Oncogene*, *30*(25), 2846-2858. doi:10.1038/onc.2011.9
- Shakery, A., Pourvali, K., Ghorbani, A., Fereidani, S. S., & Zand, H. (2018). Beta-Hydroxybutyrate Promotes Proliferation, Migration and Stemness in a Subpopulation of 5FU Treated SW480 Cells: Evidence for Metabolic Plasticity in Colon Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, *19*(11), 3287-3294. doi:10.31557/apjcp.2018.19.11.3287
- Shiomitsu, K., Sajo, E., Xia, X., Hunley, D. W., Mauldin, G. E., Li, S., & Mauldin, G. N. (2008). Radiosensitivity of canine osteosarcoma cells transfected with wild-type p53 in vitro. *Vet Comp Oncol*, *6*(3), 193-200. doi:10.1111/j.1476-5829.2008.00160.x
- Simons, P. J., van den Pangaart, P. S., Aerts, J. M., & Boon, L. (2007). Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization. *J Endocrinol*, *192*(2), 289-299. doi:10.1677/joe-06-0047
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P. D., Manicassamy, S., Munn, D. H., Lee, J. R., Offermanns, S., & Ganapathy, V. (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*, *40*(1), 128-139. doi:10.1016/j.immuni.2013.12.007
- Slingerland, J., & Pagano, M. (2000). Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol*, *183*(1), 10-17. doi:10.1002/(sici)1097-4652(200004)183:1<10::aid-jcp2>3.0.co;2-i
- Slingerland, J. M., Hengst, L., Pan, C. H., Alexander, D., Stampfer, M. R., & Reed, S. I. (1994). A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol Cell Biol*, *14*(6), 3683-3694. doi:10.1128/mcb.14.6.3683
- Suzuki, T., Dai, P., Hatakeyama, T., Harada, Y., Tanaka, H., Yoshimura, N., & Takamatsu, T. (2013). TGF- $\beta$  Signaling Regulates Pancreatic  $\beta$ -Cell Proliferation through Control of Cell Cycle Regulator p27 Expression. *Acta Histochem Cytochem*, *46*(2), 51-58. doi:10.1267/ahc.12035

- Taggart, A. K., Kero, J., Gan, X., Cai, T. Q., Cheng, K., Ippolito, M., Ren, N., Kaplan, R., Wu, K., Wu, T. J., Jin, L., Liaw, C., Chen, R., Richman, J., Connolly, D., Offermanns, S., Wright, S. D., & Waters, M. G. (2005). (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem*, *280*(29), 26649-26652. doi:10.1074/jbc.C500213200
- Tarasiuk, A., Mosinska, P., & Fichna, J. (2018). The mechanisms linking obesity to colon cancer: An overview. *Obes Res Clin Pract*, *12*(3), 251-259. doi:10.1016/j.orcp.2018.01.005
- Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2101-2114.e2105. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.058
- Thangaraju, M., Cresci, G. A., Liu, K., Ananth, S., Gnanaprakasam, J. P., Browning, D. D., Mellinger, J. D., Smith, S. B., Digby, G. J., Lambert, N. A., Prasad, P. D., & Ganapathy, V. (2009). GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res*, *69*(7), 2826-2832. doi:10.1158/0008-5472.can-08-4466
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y. S., Parker, H. E., Habib, A. M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., & Gribble, F. M. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, *61*(2), 364-371. doi:10.2337/db11-1019
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, *65*(2), 87-108. doi:10.3322/caac.21262
- Toyoshima, H., & Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, *78*(1), 67-74. doi:10.1016/0092-8674(94)90573-8
- Tunaru, S., Kero, J., Schaub, A., Wufka, C., Blaukat, A., Pfeffer, K., & Offermanns, S. (2003). PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med*, *9*(3), 352-355. doi:10.1038/nm824
- Tzanavari, T., Giannogonas, P., & Karalis, K. P. (2010). TNF-alpha and obesity. *Curr Dir Autoimmun*, *11*, 145-156. doi:10.1159/000289203
- Ulamek-Kozioł, M., Czuczwar, S. J., Januszewski, S., & Pluta, R. (2019). Ketogenic Diet and Epilepsy. *11*(10, 2510). doi:10.3390/nu11102510
- Valente-Silva, P., Lemos, C., Kofalvi, A., Cunha, R. A., & Jones, J. G. (2015). Ketone bodies effectively compete with glucose for neuronal acetyl-CoA generation in rat hippocampal slices. *NMR Biomed*, *28*(9), 1111-1116. doi:10.1002/nbm.3355

- Veech, R. L., Chance, B., Kashiwaya, Y., Lardy, H. A., & Cahill, G. F., Jr. (2001). Ketone bodies, potential therapeutic uses. *IUBMB Life*, *51*(4), 241-247. doi:10.1080/152165401753311780
- Vidali, S., Aminzadeh-Gohari, S., Vatrinet, R., Iommarini, L., Porcelli, A. M., Kofler, B., & Feichtinger, R. G. (2019). Lithium and Not Acetoacetate Influences the Growth of Cells Treated with Lithium Acetoacetate. *Int J Mol Sci*, *20*(12), 3104. doi:10.3390/ijms20123104
- Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W., Häcker, B., & Prowald, A. (2019). *Lehrbuch der Biochemie (3. Auflage)*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, *137*(3), 413-431. doi:10.1016/j.cell.2009.04.037
- Walczyk, T., & Wick, J. Y. (2017). The Ketogenic Diet: Making a Comeback. *Consult Pharm*, *32*(7), 388-396. doi:10.4140/TCP.n.2017.388
- Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Busch, C., & Schrenk, D. (2008). Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem*, *19*(9), 587-593. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.08.002
- Waldman, T., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*, *55*(22), 5187-5190.
- Wang, Q., Sun, Z., Du, L., Xu, C., Wang, Y., Yang, B., He, N., Wang, J., Ji, K., Liu, Y., & Liu, Q. (2018). Melatonin Sensitizes Human Colorectal Cancer Cells to  $\gamma$ -ray Ionizing Radiation In Vitro and In Vivo. *Int J Mol Sci*, *19*(12). doi:10.3390/ijms19123974
- Warburg, O. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften*, *12*(50), 1131-1137. doi:10.1007/BF01504608
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1926). Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. *Klinische Wochenschrift*, *5*(19), 829-832. doi:10.1007/BF01726240
- Weber, D. D., Aminzadeh-Gohari, S., & Kofler, B. (2018). Ketogenic diet in cancer therapy. *Aging (Albany NY)*, *10*(2), 164-165. doi:10.18632/aging.101382
- Weinberg, R. A. (2014). *The Biology of Cancer (2 ed.)*. New York: Garland Science.
- Westman, E. C. (2002). Is dietary carbohydrate essential for human nutrition? *Am J Clin Nutr*, *75*(5), 951-953; author reply 953-954. doi:10.1093/ajcn/75.5.951
- Wilson, W. R., & Hay, M. P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, *11*(6), 393-410. doi:10.1038/nrc3064

- Wirrell, E. C. (2008). Ketogenic ratio, calories, and fluids: do they matter? *Epilepsia*, 49 Suppl 8(Suppl 8), 17-19. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01825.x
- Xie, Z., Zhang, D., Chung, D., Tang, Z., Huang, H., Dai, L., Qi, S., Li, J., Colak, G., Chen, Y., Xia, C., Peng, C., Ruan, H., Kirkey, M., Wang, D., Jensen, L. M., Kwon, O. K., Lee, S., Pletcher, S. D., Tan, M., Lombard, D. B., White, K. P., Zhao, H., Li, J., Roeder, R. G., Yang, X., & Zhao, Y. (2016). Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine beta-Hydroxybutyrylation. *Mol Cell*, 62(2), 194-206. doi:10.1016/j.molcel.2016.03.036
- Xiong, Y., Miyamoto, N., Shibata, K., Valasek, M. A., Motoike, T., Kedzierski, R. M., & Yanagisawa, M. (2004). Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(4), 1045-1050. doi:10.1073/pnas.2637002100
- Yadollahpour, A., Rezaee, Z., Bayati, V., Tahmasebi Birgani, M. J., & Negad Dehbashi, F. (2018). Radiotherapy Enhancement with Electroporation in Human Intestinal Colon Cancer HT-29 Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 19(5), 1259-1262. doi:10.22034/apjcp.2018.19.5.1259
- Yamaji, Y., Okamoto, M., Yoshida, H., Kawabe, T., Wada, R., Mitsushima, T., & Omata, M. (2008). The effect of body weight reduction on the incidence of colorectal adenoma. *Am J Gastroenterol*, 103(8), 2061-2067. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.01936.x
- Zahra, A., Fath, M. A., Opat, E., Mapuskar, K. A., Bhatia, S. K., Ma, D. C., Rodman, S. N., III, Snyders, T. P., Chenard, C. A., Eichenberger-Gilmore, J. M., Bodeker, K. L., Ahmann, L., Smith, B. J., Vollstedt, S. A., Brown, H. A., Hejleh, T. A., Clamon, G. H., Berg, D. J., Szwed, L. I., Spitz, D. R., Buatti, J. M., & Allen, B. G. (2017). Consuming a Ketogenic Diet while Receiving Radiation and Chemotherapy for Locally Advanced Lung Cancer and Pancreatic Cancer: The University of Iowa Experience of Two Phase 1 Clinical Trials. *Radiat Res*, 187(6), 743-754. doi:10.1667/rr14668.1
- Zaki, M. H., Boyd, K. L., Vogel, P., Kastan, M. B., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T. D. (2010). The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity*, 32(3), 379-391. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.003
- Zilberter, T., & Zilberter, Y. (2018). Ketogenic Ratio Determines Metabolic Effects of Macronutrients and Prevents Interpretive Bias. *Front Nutr*, 5, 75. doi:10.3389/fnut.2018.00075

## **Appendix**

- I        Abkürzungsverzeichnis
- II        Abbildungsverzeichnis
- III       Tabellenverzeichnis
- IV        Danksagung
- V        Lebenslauf

## I Abkürzungsverzeichnis

|                 |   |
|-----------------|---|
| 3-OHB           | β-Hydroxybutyrat                                  |
| 3-OHB-DH        | β-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase                    |
| 5-FU            | 5-Fluoruracil                                     |
| Abb.            | Abbildung   |
| AcAc            | Acetoacetat                                       |
| ACAT            | Acetoacetyl-CoA-Acetyltransferase                 |
| AML M5          | Akute Monoblasten-/Monozytenleukämie              |
| APC-Gen         | Adenomatöses Polyposis Coli Gen                   |
| Aqua dest.      | Aqua destillata                                   |
| Arg             | Arginin   |
| bp              | Basenpaare  |
| cAMP            | Zyklisches Adenosinmonophosphat                   |
| CCK             | Cell Counting Kit                                 |
| CDK             | Cyclin-dependent kinase                           |
| CDKN            | Cyclin-dependent kinase inhibitor                 |
| cDNA            | komplementäre Desoxyribonukleinsäure              |
| CED             | Chronisch entzündliche Darmerkrankung             |
| CFA             | Colony-Forming-Assay                              |
| CIP/KIP         | CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid                                 |
| CoA             | Coenzym A   |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid                                  |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure                            |
| DTT             | Dithiothreitol                                    |
| ECL             | Enhanced Chemiluminescence                        |
| FAP             | Familiäre adenomatöse Polyposis coli              |
| FCS             | Fetales Kälberserum                               |
| FFA             | Free fatty acid                                   |
| FFAR            | Free fatty acid receptor                          |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| FOXO-Proteine                 | Forkhead-Box-Proteine der Klasse O          |
| GABA                          | $\gamma$ -Aminobuttersäure                  |
| GLP                           | Glucagon-like peptide                       |
| Glu                           | Glutaminsäure                               |
| GPR                           | G-Protein gekoppelter Rezeptor              |
| GTP                           | Guanosintriphosphat                         |
| Gy                            | Gray  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                          |
| HIF                           | Hypoxia-inducible factor                    |
| His                           | Histidin                                    |
| HMGCL                         | Hydroxymethylglutarly-CoA-Lyase             |
| HMGCS                         | Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase          |
| HRP                           | Horseradish peroxidase                      |
| HSL                           | Hormonsensitive Lipase                      |
| IARC                          | International Agency for Research on Cancer |
| Ig                            | Immunglobulin                               |
| IGF                           | Insulin-like growth factor                  |
| IL                            | Interleukin                                 |
| INF                           | Interferon                                  |
| K <sub>M</sub>                | Michaelis-Menten-Konstante                  |
| LCT                           | Long-chain triglyceride                     |
| LFD                           | Low fat diet                                |
| LiAcAc                        | Lithiumacetoacetat                          |
| LiCl                          | Lithiumchlorid                              |
| MCP                           | Monocyte chemoattractant protein            |
| MCT                           | Monocarboxylat-Transporter                  |
| MLH                           | MutL Homolog                                |
| MMR                           | DNA mismatch repair                         |
| mRNA                          | Messenger RNA                               |
| MSH                           | MutS Homolog                                |
| mut                           | Mutation                                    |
| NaAcAc                        | Natriumacetoacetat                          |

|                |  |
|----------------|--|
| NAD            | Nicotinamid-adenin-dinukleotid                       |
| NLRP3          | NLR family pyrin domain containing 3                 |
| NMDA           | N-Methyl-D-Aspartat                                  |
| O <sub>2</sub> | Sauerstoff   |
| OD             | Optische Dichte                                      |
| PBGD           | Porphobilinogen-Deaminase                            |
| PBS            | Phosphate-buffered saline                            |
| PCNA           | Proliferating cell nuclear antigen                   |
| PCR            | Polymerase-Kettenreaktion                            |
| PGD            | Prostaglandin D                                      |
| PGE            | Prostaglandin E                                      |
| PI3K           | Phosphoinositid-3-Kinase                             |
| PKA            | Proteinkinase A                                      |
| PLC            | Phospholipase C                                      |
| RNA            | Ribonukleinsäure                                     |
| ROS            | Reactive oxygen species                              |
| rpm            | Revolutions per minute                               |
| s.             | siehe  |
| SCFA           | Short chain fatty acid                               |
| SCOT           | 3-Ketoacyl-CoA-Transferase                           |
| SDS-PAGE       | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SLC            | Solute Carrier                                       |
| SV-40          | Simian-Virus 40                                      |
| TBE-Puffer     | Tris-Borat-EDTA-Puffer                               |
| TBS            | Tris-buffered saline                                 |
| TGF            | Transforming growth factor                           |
| TGS            | Tris/Glycine/SDS                                     |
| TNF            | Tumornekrosefaktor                                   |
| UICC           | Union for International Cancer Control               |
| wt             | Wildtyp  |



## II Abbildungsverzeichnis

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Abb. 1 -  | Geschlechterspezifische Neuerkrankungs- und Sterberate von Darmkrebs pro 100 000 Einwohner in Deutschland von 1999 bis 2018/2019, Prognose bis 2022 ..... | 2  |
| Abb. 2 -  | Adenom-Karzinom-Sequenz (vereinfachte Darstellung).....   | 3  |
| Abb. 3 -  | Ketonkörpersynthese.....  | 10 |
| Abb. 4 -  | 96-well Platte (schematische Darstellung).....  | 34 |
| Abb. 5 -  | Proteinexpressionsanalyse: p53 .....  | 45 |
| Abb. 6 -  | Proteinexpressionsanalyse: p27 und p21 .....  | 46 |
| Abb. 7 -  | Genexpressionsanalyse: GPR41, GPR43 und GPR109A .....   | 48 |
| Abb. 8 -  | Genexpressionsanalyse: MCT-1 und MCT-4.....   | 49 |
| Abb. 9 -  | Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc, LiCl. WST-8-Test.....   | 50 |
| Abb. 10 - | Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc, LiCl. Kristallviolett-Test .....                                  | 51 |
| Abb. 11 - | Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: NaAcAc und LiAcAc. WST-8-Test. ....   | 52 |
| Abb. 12 - | Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: Kontrolle und DMSO. WST-8-Test.....   | 53 |
| Abb. 13 - | Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und 3-OHB + LiAcAc. WST-8-Test .....                               | 54 |
| Abb. 14 - | Kurzzeit-Zellproliferation anhand der OD für die Konditionen: Kontrolle, 3-OHB, LiAcAc und 3-OHB + LiAcAc. Kristallviolett-Test.....                      | 55 |
| Abb. 15 - | Strahlensensibilität der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29. Bestrahlungskurven nach WST-8-Test .....   | 57 |
| Abb. 16 - | Strahlensensibilität der Zelllinien CaCo-2, HCT-116 und HT-29. Bestrahlungskurven nach Kristallviolett-Test.....  | 58 |
| Abb. 17 - | Effekt der Ketonkörper auf die Kurzzeit-Proliferation bei einer Strahlendosis von 2 Gy. WST-8-Test .....  | 60 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Abb. 18 - | Effekt der Ketonkörper auf die Kurzzeit-Proliferation bei einer Strahlendosis von 2 Gy. Kristallviolett-Test.....   | 61 |
| Abb. 19 - | Koloniebildung ohne Strahlenbehandlung unter a) normoxischen und unter b) hypoxischen Bedingungen. Eingescannte CFA-Ansätze nach Kristallviolett-Test ..... | 63 |
| Abb. 20 - | Koloniebildung in Abhängigkeit zur ausgesetzten Strahlendosis. Prozentuale Auswertung der Koloniebildung .....  | 64 |
| Abb. 21 - | Koloniebildung unter hypoxischen Verhältnissen nach Strahlenbehandlung mit 2 Gy. Eingescannter CFA-Ansatz nach Kristallviolett-Test .....                   | 65 |
| Abb. 22 - | Koloniebildung unter hypoxischen Verhältnissen nach Strahlenbehandlung mit 2 Gy. Prozentuale Auswertung der Koloniebildung.....                             | 66 |
| Abb. 23 - | Zusammentragung von zwei CFAs. Koloniebildung unter hypoxischen Verhältnissen nach Strahlenbehandlung mit 2 Gy.....   | 67 |

### **III Tabellenverzeichnis**

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| Tabelle 1 -  | Verwendete Kolonkarzinomzelllinien .....                           | 19 |
| Tabelle 2 -  | Sonstige verwendete Zelllinien. ....                               | 20 |
| Tabelle 3 -  | Verwendete Geräte und Verbrauchsutensilien .....                   | 20 |
| Tabelle 4 -  | Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....                        | 24 |
| Tabelle 5 -  | Verwendete Antikörper .....  | 27 |
| Tabelle 6 -  | Verwendete Primer.....   | 28 |
| Tabelle 7 -  | Verwendete Bausätze (Kits) .....                                   | 29 |
| Tabelle 8 -  | Verwendete Gele .....  | 30 |
| Tabelle 9 -  | Verwendete Softwares.....  | 30 |
| Tabelle 10 - | Schritte der PCR für die Primer PBGD, MCT-1 und MCT-4 .....        | 39 |
| Tabelle 11 - | Schritte der PCR für die Primer GPR41, GPR43 und GPR109A.....      | 40 |
| Tabelle 12 - | Zusammensetzung der Lösungen für die Proteinexpressionsanalyse ... | 41 |

## **IV Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten.

Für die ausgezeichnete Betreuung sowie die Überlassung des Themas dieser Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei Frau Prof. Kämmerer bedanken, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und mich während der gesamten Arbeit tatkräftig unterstützte.

Für die positive Begleitung und Unterstützung in seiner Funktion als Klinikdirektor der Universitäts-Frauenklinik Würzburg möchte ich mich außerdem ausdrücklich bei Herrn Prof. Wöckel bedanken.

Zudem möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Ergün für die Übernahme der Zweitbetreuerschaft dieser Arbeit bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Frau Michaela Kapp, die mich bei den experimentellen Arbeiten anleitete und stets für Rückfragen zur Verfügung stand.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei Annika Schmitt.

Meinen Eltern danke ich für ihre Geduld und ihre Unterstützung, ohne welche mein Studium sowie das Verfassen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.