

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und
Kinderchirurgie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Untersuchungen zur Bedeutung
von Ketonkörper als Energieträger für den Stoffwechsel
humaner gastrointestinaler Karzinomzelllinien**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Marjam Heidari-Movahed

aus Würzburg

Würzburg, Juli 2014

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Harald Wajant
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2015

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Eigenschaften malignen Wachstums	1
1.2	Biochemische Grundlagen des Zellstoffwechsels	2
1.3	Der maligne Stoffwechsel	5
1.4	Zur Physiologie von Ketonkörper	7
1.5	Ziele.....	10
2	Fragen	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Zelllinien	13
3.2	Zellernte	13
3.3	Kulturmedien	14
3.4	Experimentelles Design	15
3.5	Ketonkörper	16
3.6	Untersuchungen bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen.....	16
3.7	Kristallviolett-Assay.....	16
3.8	Bestimmung von Glukose, Laktat und Ketonkörper	17
3.9	Die Reverse Transkription (RT)- quantitative Polymerase Kettenreaktion.....	18
3.9	Auswertung und Statistik	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien	23
4.2	Der Einfluss von Ketonkörper auf das Zellwachstum	25
4.3	Untersuchungen zur Verstoffwechslung von Ketonkörper.....	31
4.4	Glukoseverbrauch und Laktatbildung.....	35
4.5	Expression der an der Ketolyse beteiligten Enzyme	38
5	Beantwortung der Fragen	39
6	Diskussion	41
6.1	Charakteristika des malignen Stoffwechsels.....	41
6.2	Die Bedeutung von Ketonkörper für den Zellstoffwechsel	42
6.3	Metabolisierung von Ketonkörper durch maligne Zellen.....	45
7	Ausblick	48
8	Zusammenfassung	49
9	Literaturverzeichnis	51
10	Appendix	58
11	Abbildungsverzeichnis	69
12	Tabellenverzeichnis	71
	Danksagung, Curriculum Vitae	

1 Einleitung

1.1 Eigenschaften malignen Wachstums

Nach Angaben des deutschen epidemiologischen Krebsregisters und des Robert-Koch-Instituts sind im Jahr 2012 allein in Deutschland ca. 38 800 Männer und 31 100 Frauen an kolorektalem Karzinom erkrankt. Im gleichen Jahr wurden 9 100 Männer und 6 200 Frauen mit der Diagnose Magenkrebs konfrontiert. Damit stellen Krebserkrankungen sowohl in Deutschland als auch weltweit die zweit- bzw. dritthäufigste Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen dar. Bis 2030 wird sich die Zahl der durch Krebs verursachten Todesfälle weltweit auf ca. 12 Millionen erhöht haben (www.who.int).

Es gilt als akzeptiert, dass die Entstehung von Krebs, die so genannte Kanzerogenese, auf Mutationen in bestimmten Bereichen des Genoms zurückgeht. Im Prinzip können sämtliche Gene mutieren, doch führen Mutationen insbesondere in solchen Genen zur Entstehung von Krebs, die in ihrer gesunden Form Zellwachstum bzw. Zelldifferenzierung regulieren. Solche Gene werden auch als Protoonkogene bzw. Tumorsuppressorgene bezeichnet. In der Regel sind mehrere mutagene Ereignisse in definierter Reihenfolge notwendig, damit sich Mutationen manifestieren (Fearon ER, Vogelstein B, 1990). Eine Vielzahl physikalischer, chemischer und biologischer Faktoren sind als Auslöser von Mutationen bekannt (Loeb LA, Harris CC, 2008; Javier RT, Butel JS, 2008).

In ihrem viel beachteten Übersichtsartikel *The Hallmarks of Cancer* aus dem Jahr 2000 beschreiben die beiden amerikanischen Krebsforscher Hanahan und Weinberg wesentliche Eigenschaften malignen Wachstums (Hanahan D, Weinberg A, 2000; 2011). Hierzu gehören: 1. Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen (*sustaining proliferative signals*); 2. Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen (*evading growth suppressors*); 3. Die Fähigkeit, in umliegendes Gewebe zu infiltrieren und zu metastasieren (*activating invasion and metastasis*); 4. Uneingeschränkte Teilungsfähigkeit (*enabling replicative immortality*); 5. Induktion von Angiogenese zur Aufrechterhaltung der Nährstoff-

und Sauerstoffversorgung (*inducing angiogenesis*) und 6. Umgehung des Zelltods (*resisting cell death*). Diese sechs grundlegenden Eigenschaften / Merkmale ermöglichen es Krebszellen, unabhängig von jeglicher endogener bzw. exogener Regulation unkontrolliert im Körper zu wachsen.

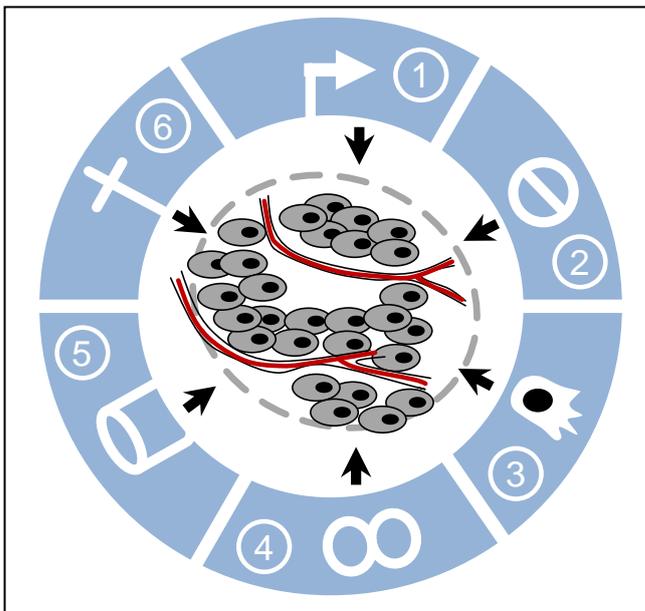


Abb. 1.1: The Hallmarks of Cancer. Dargestellt sind die von den Autoren Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 beschriebenen 6 Eigenschaften malignen Wachstums. Diese sind: (1) Sustaining proliferative signals; (2) Evading growth suppressors; (3) Activating invasion and metastasis; (4) Enabling replicative immortality; (5) Inducing angiogenesis; (6) Resisting cell death. Eigener Entwurf verändert nach Hanahan und Weinberg, 2000. Im Jahr 2008 erweiterten Kroemer und Pouyssegur diese Liste u.a. um Charakteristika im Tumorstoffwechsel (Kroemer G, Pouyssegur J, 2008). Hierauf hatten bereits Gatenby und Gillies im Jahr 2004 hingewiesen (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004).

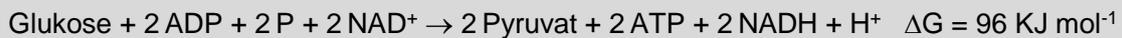
In der aktualisierten Version ihres Artikels aus dem Jahr 2011 haben die Autoren auch den veränderten zellulären Energiestoffwechsel als eine Eigenschaft malignen Wachstums mit aufgenommen. Erste experimentelle Hinweise hierzu präsentierte der Nobelpreisträger Otto Warburg bereits in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts (Warburg O, Minami S, 1923; Warburg O et al., 1924). Für diesen Stoffwechsel, der Charakteristika des anaeroben Stoffwechsels aufweist, ist Glukose der unverzichtbare Energieträger. Andererseits sind Krebszellen in der Lage, ebenfalls Energieträger wie Glutamin, Fettsäuren und Ketonkörper zu verwerten. Hierzu werden diese in den Mitochondrien oxidativ verstoffwechselt, was die Anwesenheit von Sauerstoff erfordert (Moreno-Sánchez, R et al., 2009).

1.2 Biochemische Grundlagen des Zellstoffwechsels

Zellen benötigen zum Erhalt ihrer funktionellen und strukturellen Integrität Energie in ausreichender und geeigneter Form. Die Zelle deckt dabei ihren Energie-

bedarf aus dem Abbau von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen – und zwar je nach Stoffwechsellage zu unterschiedlichen Teilen. Hierzu werden diese Makronährstoffe in biochemischen Prozessen umgewandelt, die in ihrer Gesamtheit als Stoffwechsel bezeichnet werden. Dabei entstehen verschiedenste Zellkomponenten wie die Vorstufen von Makromolekülen (z. B. Pentosen für Nucleinsäuren), das für reduktive Biosynthesen wichtige Reduktionsäquivalent NADPH¹⁾ und der zelluläre Energieträger Adenosintriphosphat (ATP).

Ein überaus wichtiger Energielieferant für den Zellstoffwechsel ist Traubenzucker (Glukose), der im Zytosol über den *Embden-Meyerhof-Weg* (Glykolyse) metabolisiert wird. Bei der Glykolyse, über die nahezu sämtliche biologischen Systeme verfügen, handelt es sich um einen mehrstufigen enzymatischen Abbau von Glukose zur Energiegewinnung. In der Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat oxidiert²⁾, wobei gleichzeitig ATP und Reduktionsäquivalente, die auch als Cofaktoren bezeichnet werden, entstehen:



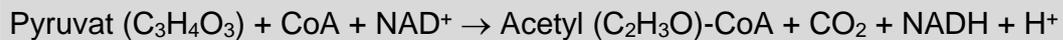
Biochemische Oxidationsvorgänge stellen in aller Regel Dehydrierungen dar, die von so genannten Dehydrogenasen katalysiert werden; ihre Cofaktoren sind NAD⁺ oder NADP⁺, die als Wasserstoffakzeptor fungieren und entsprechend zu NADH + H⁺ oder NADPH + H⁺ reduziert werden. In aeroben Organismen stellt die Glykolyse die Vorstufe von Citratzyklus und Atmungskette dar; hier wird nahezu die gesamte in der Glukose gespeicherte Energie in Form von ATP gewonnen. Die Reaktionsschritte der Glykolyse laufen unabhängig von der Sauerstoffversorgung der Zelle ab. Dagegen wird der weitere Stoffwechselweg des Pyruvats durch das Sauerstoffangebot beeinflusst.

In Anwesenheit von Sauerstoff (Normoxie) wird Pyruvat in die Mitochondrien überführt. Den Zugang zum Citratzyklus stellt der Multienzymkomplex Pyruvat-

¹⁾ Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat.

²⁾ Der Kohlenstoff in Pyruvat weist eine höhere Oxidationsstufe (nämlich +0,7) auf als in Glukose (±0). Die Oxidationsstufe ergibt sich aus dem Verhältnis von Kohlenstoff (C) zu Wasserstoff (H). Das C:H-Verhältnis in Glukose beträgt 1:2 und in Pyruvat 1:1,3. Das bedeutet, dass der Kohlenstoff in Glukose stärker reduziert ist als in Pyruvat.

Dehydrogenase her, der durch oxidative Decarboxylierung aus Pyruvat *Acetyl-Coenzym A* (Acetyl-CoA) herstellt:



Acetyl-CoA wird anschließend im Citratzyklus vollständig zu Kohlendioxid (CO₂) oxidiert. Für sämtliche Makronährstoffe, also Aminosäuren, Fettsäuren und Kohlenhydrate, stellt der Citratzyklus den zentralen katabolen Stoffwechselweg dar. Die Oxidation der Kohlenstoffatome im Acetyl-CoA geht mit der Reduktion der Cofaktoren NAD⁺ und FAD³⁾ einher. Pro Molekül Acetyl-CoA werden in vier Dehydrierungsschritten⁴⁾ vier Paare an Wasserstoffatomen (4H⁺ + 4H⁻ = 8H⁺ + 8e⁻ = 4H₂) auf drei Moleküle NAD⁺ und ein Molekül FAD übertragen. Die Nettobilanz des Citratzyklus sieht dabei wie folgt aus (ohne GTP-Bildung):



Die in der Glykolyse und im Citratzyklus reduzierten Cofaktoren NAD⁺ und FAD werden an der Atmungskette reoxidiert und dabei mit der Bildung von ATP gekoppelt, was als oxidative Phosphorylierung bezeichnet wird. Die Energie zur Synthese von ATP wird dabei über einen Protonengradienten durch chemiosmotische Kopplung gewonnen (Mitchell P, 1961). Die Elektronen ihrerseits werden auf molekularen Sauerstoff übertragen, der dadurch zu Wasser (H₂O) reduziert wird; dabei entstehen bis zu 30 mol ATP pro mol Glukose. Bei der oxidativen Phosphorylierung handelt es sich chemisch um die so genannte Knallgasreaktion, einer extrem exothermen Reaktion von Wasserstoff mit Sauerstoff:



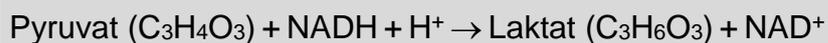
³⁾ Flavin-Adenin-Dinukleotid.

⁴⁾ Hierbei handelt es sich um die Reaktionen der Isocitrat-Dehydrogenase, der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, der Succinat-Dehydrogenase und der Malat-Dehydrogenase.

⁵⁾ Die Angaben zur Energiegewinnung aus der Knallgasreaktion schwanken; so ist bei Horn F, Biochemie des Menschen, 5. Auflage 2012, Thieme-Verlag, ein Wert von 239 KJ x mol⁻¹ nachzulesen.

Aerobe Organismen haben im Laufe ihrer stammesgeschichtlichen Entwicklung gelernt, diese Form der Energiegewinnung unter strikt kontrollierten Bedingungen zu nutzen („biologische Knallgasreaktion“).

Bei Abwesenheit von Sauerstoff (Hypoxie) verbleibt Pyruvat im Cytosol und wird dort mit Hilfe der Laktatdehydrogenase zu Laktat reduziert; die so genannte Milchsäuregärung:



Dabei werden lediglich die für die Glykolyse notwendigen Reduktionsäquivalente regeneriert ($\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+$), ohne dass zusätzliches ATP gebildet wird; damit entspricht der ATP-Gewinn bei der Milchsäuregärung dem der Glykolyse.

1.3 Der maligne Stoffwechsel

Tumorzellen weisen oftmals einen veränderten Energiestoffwechsel auf. So beobachteten bereits 1923 Otto Heinrich Warburg und Seigo Minami, dass Tumoren auch in Gegenwart von Sauerstoff Glukose zu Laktat vergären (Warburg O et al., 1923). Dies widerspricht der bis dahin gültigen Erfahrung, dass gesunde Körperzellen in Gegenwart von Sauerstoff Glukose zu Kohlendioxid und Wasser oxidieren. Hierfür sind die Enzyme des Citrat-Zyklus und die Komplexe der Atmungskette, die in den Mitochondrien lokalisiert sind, notwendig. Die bioenergetische Besonderheit von Tumorzellen, Laktat auch in Gegenwart von Sauerstoff zu bilden, wurde von Warburg als „aerobe Glykolyse“ bzw. von seinem Umfeld als *Warburg-Effekt* bezeichnet. Aufgrund der geringen Energieausbeute des *Warburg-Effekts* weisen Tumorzellen einen erhöhten Verbrauch an Glukose auf (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004).

Die genetischen Ursachen, die zur Ausprägung des Warburg-Effektes führen, sind weitgehend bekannt. Mutationen in Protoonkogenen (z.B. Ras und Akt) bzw. Tumorsuppressorgenen (z.B. LKB1 und VHL) führen u.a. zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (*hypoxia-inducible factor*), der eine zentrale Rolle im Tumorstoffwechsel einnimmt. Schnell wachsende Tumoren geraten

somit sehr rasch in Hypoxie und verbrauchen dabei Glukose im Übermaß. Fehlt ihnen in dieser Situation HIF-1, dann können sie nicht mehr wachsen, da dieser Transkriptionsfaktor ihnen hilft, unter Hypoxie Glukose in Energie umzuwandeln (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004; Shaw RJ, 2006). Hierzu steigert HIF-1 die Expression von Enzymen der Glykolyse, während die Synthese und Funktion mitochondrialer Enzyme für den weiteren Abbau von Glukose-Derivaten partiell bzw. komplett inhibiert werden (Moreno-Sánchez R et al., 2007). Zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung induziert HIF-1 außerdem die Bildung neuer Blutgefäße (Neovaskularisierung). Damit Krebszellen ihren erhöhten Bedarf an Glukose decken können, wird durch HIF-1 die Überexpression spezifischer Glukosetransporter (GLUT) gesteuert. Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften werden insbesondere die für Glukose hochaffinen Transporter GLUT-1 und GLUT-3 exprimiert (Moreno-Sánchez R et al., 2009).

Der Stoffwechsel von Krebszellen ist sicherlich der besonderen Versorgungssituation *in vivo* geschuldet, die sich von der Versorgung gesunder Gewebe deutlich unterscheidet. Der Begriff „Tumorhypoxie“ deutet darauf hin, dass Tumoren trotz ihrer Fähigkeit zur Angiogenese eindeutig Limitierungen bei der Versorgung mit Sauerstoff unterliegen. In Geweben wird von Hypoxie bei einer Sauerstoffkonzentration von weniger als 2 %⁶⁾ gesprochen (Bertout JA et al., 2008). Der wesentliche Grund für die Tumorhypoxie ist, dass die durch Angiogenese induzierten Gefäße nur unzureichend den Tumor versorgen können (Kim JW et al., 2007; Vaupel P et al., 1991, 2007, 2013; Vaupel P, Mayer A, 2007; Holm E, 2007). Untersuchungen von Gatenby und Gillies verdeutlichen eindrucksvoll das Ausmaß dieser Minderversorgung. So befinden sich die Zellen eines soliden Tumors bereits in Hypoxie, wenn sie weiter als 5 bis 10 Zellschichten vom Tumorstroma mit seinen versorgenden Blutgefäßen entfernt liegen (Gatenby RA et al., 2007). Die in Hypoxie befindlichen Tumorzellen sichern dabei ihr Überleben ausschließlich mit Glukose, dem einzigen Energieträger, aus dem auch ohne Sauerstoff („anaerob“) Energie in Form von ATP gewonnen werden kann (Krebs H, 1972; Racker E, 1974).

⁶⁾ Dies entspricht einem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von 15,2 mm Quecksilber (Hg) auf Meereshöhe; der pO_2 -Wert für 21 % Sauerstoff beträgt 159,6 mm Hg nach folgender Formel: $(760 \text{ mm Hg} / 100) \times 21 \%$.

Es gilt als akzeptiert, dass Glukose der wesentliche Energieträger für Tumoren darstellt. Darüber hinaus sind Krebszellen auch in der Lage, energiereiche Substrate wie Glutamin, Fettsäuren und Ketonkörper zu nutzen, deren Verstoffwechslung eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff erfordert. Auch Warburg beschreibt bereits in einer seiner frühen Publikationen, dass Tumorzellen zur oxidativen Phosphorylierung fähig sind und dass – so seine Schlussfolgerung – zum Abtöten von Tumorzellen die Hemmung beider Stoffwechselwege, also Milchsäuregärung und Atmung, nötig sind (Warburg O et al., 1924).

1.4 Zur Physiologie von Ketonkörper

Zu den Ketonkörper gehören Acetacetat, sein Reduktionsprodukt D-3-Hydroxybutyrat, das auch als β -Hydroxybutyrat bezeichnet wird, und das Decarboxylierungsprodukt Aceton. Für den Stoffwechsel sind ausschließlich Acetacetat und D-3-Hydroxybutyrat von Bedeutung (Laffel L, 1999). Ketonkörper weisen einen höheren Brennwert als Pyruvat auf, was mit dem höheren Anteil an Wasserstoff (H) pro Kohlenstoffatom (C) erklärt wird. So beträgt das C:H-Verhältnis für D-3-Hydroxybutyrat ($C_4H_8O_3$) 1:2 und für Pyruvat ($C_3H_4O_3$) 1:1,3 (Veech RL, 2004). Auch der Vergleich zwischen Ketonkörper und Glukose hinsichtlich ihrer Energieausbeute, wobei beide Verbindungen ein identisches C:H-Verhältnis von 1:2 aufweisen, bringt Erstaunliches zum Vorschein: während aus 100 g D-3-Hydroxybutyrat ca. 10,5 Kg ATP gebildet werden, reichen 100 g Glukose lediglich zur Bildung von ca. 8,5 Kg ATP aus⁷⁾ (Salway JG, 2004). Diese Steigerung der ATP-Ausbeute um 23,5 % bei der Verstoffwechslung von Ketonkörper im Gegensatz zur Glukose ist sicherlich damit zu erklären, dass der Kohlenstoff in D-3-Hydroxybutyrat eine niedrigere Oxidationsstufe aufweist als in Glukose⁸⁾. Herzmuskel und die Nebennieren bevorzugen Ketonkörper (Acetacetat) sogar gegenüber Glukose. Bei andauernder Nahrungsrestriktion deckt

⁷⁾ Die Berechnungen basieren auf der Annahme, dass mit einem Mol Glukose 30 mol ATP gewonnen werden (1 mol NADH führt zur Bildung von 2,5 mol ATP; 1 mol $FADH_2$ führt zur Bildung von 1,5 mol ATP) und dass aus einem 1 mol D-3-Hydroxybutyrat 21,5 mol ATP gebildet werden. Folgende Molgewichte sind für die Kalkulation einzusetzen: ATP (507,18 g \times mol⁻¹); D-3-Hydroxybutyrat (104,10 g \times mol⁻¹); Glukose (180,16 g \times mol⁻¹).

⁸⁾ Kohlenstoff weist in diesen Kohlenwasserstoff-Verbindungen folgende Oxidationsstufe auf: Glukose (± 0), Pyruvat (+0,7), Acetyl-CoA (± 0), D-3-Hydroxybutyrat (-0,5). Zum Begriff Oxidationsstufe bzw. Oxidationszahl siehe auch unter „Oxidationszahl“ bei Wikipedia.

das Gehirn ca. 75 % seines Energiebedarfs durch Ketonkörper (Owen OE et al., 1967). Auch Neugeborene decken in den ersten Lebenstagen ca. 25 % ihres Energiebedarfs mit Ketonkörper (Bourgneres PE et al., 1986).

Ketonkörper entstehen physiologisch bei bestimmten Stoffwechselsituationen, wie z.B. beim Fasten bzw. Hungern oder pathophysiologisch bei der diabetischen Ketoazidose (Cahill GF, 1976; Laffel L, 1999). Der Hungerstoffwechsel ist charakterisiert durch niedrige Blutzucker- und Insulinspiegel. Sowohl beim Fasten als auch mit einer ketogenen Ernährung können nicht-diabetische Probanden nach 1 bis 2 Wochen Ketonkörperspiegel von bis zu 6 mmol/L erreichen im Vergleich zu postabsorptiven Werten um ca. 0,1 mmol/L bei normalernährten Gesunden (Cahill GF, 1976; Laffel L, 1999; VanItallie TB, Neufert TH, 2003; Veech RL, 2004). Von diesen erhöhten Ketonkörperspiegeln im Rahmen der Ketose ist die pathologische Situation der Ketoazidose bei einem nicht-behandelten Diabetes mellitus abzugrenzen, bei dem Ketonkörperspiegel von über 25 mmol/L erreicht werden (Laffel L, 1999).

Tab. 1.1: Die an der Ketogenese beteiligten Enzyme. Die Reaktionen 1-3 zur Bildung von Acetacetat finden in den Mitochondrien der Leber statt (Lynen-Zyklus); Reaktion 4 zur Bildung von D-3-Hydroxybutyrat findet im Zytosol nicht nur von Leberzellen statt. Ketonkörper werden gebildet, wenn die Fettsäureoxidation die Glukoseoxidation und Lipogenese überwiegt (McGarry JD, Forster DW, 1980).

Reaktion	Enzym ¹⁾
(1) 2 Acetyl-CoA → Acetacetyl-CoA + CoA	3-Ketothiolase ²⁾
(2) Acetacetyl-CoA + Acetyl-CoA → HMG-CoA	HMG-CoA-Synthase ³⁾
(3) HMG-CoA → Acetacetat + Acetyl-CoA	HMG-CoA-spaltendes Enzym ⁴⁾
(4) Acetacetat + NADH + H ⁺ → D-3-HBD + NAD ⁺	D-3-HBD ⁵⁾

¹⁾ Die Nomenklatur folgt der von Stryer „Biochemie“ (Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L), 7. Auflage, Springer-Spektrum, 2013; ²⁾ wird auch als Acetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT) bezeichnet; ³⁾ Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase, die auch als β-HMG-CoA (β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA) bzw. als 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA bezeichnet wird; ⁴⁾ auch als HMG-CoA-Lyase bekannt; ⁵⁾ D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase.

Ketonkörper werden in erster Linie durch Leberzellen gebildet („Ketogenese“). Der wesentliche Grund hierfür ist sicherlich, dass in die Leber das mit Nährstoffen angereicherte Blut aus den Verdauungsorganen über die Pfortader mündet. Die im Lysin-Zyklus gebildeten Ketonkörper werden über die Blutbahn in die peripheren Gewebe transportiert, dort in Acetyl-CoA umgewandelt („Ketolyse“) und in den Citratzyklus zur Energiegewinnung eingeschleust.

Der erste Schritt zur Synthese von Ketonkörper („Ketogenese“) ist die Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA; diese Reaktion wird durch das Enzym 3-Ketothiolase katalysiert (Tab. 1.1). Anschließend verliert Acetacetyl-CoA in zwei Reaktionen sein Coenzym A (CoA) und freies Acetacetat entsteht. Dieser Schritt wird durch die Enzyme 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA-Synthase und HMG-CoA-spaltendes Enzym vermittelt (Lynen F, Ochoa S, 1953). Das gebildete Acetacetat wird mit Hilfe des Enzyms D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (D-3-HBD) zu D-3-Hydroxybutyrat reduziert. Das Verhältnis von Acetacetat zu D-3-Hydroxybutyrat beträgt im Blut ca. 1: 10. Der Sinn der Ketonkörper-Bildung ist, das aus der Fettsäureoxidation vermehrt gebildete Acetyl-CoA vor weiterer Oxidation in der Leber zu schützen und es in Form von Ketonkörper zur Endoxidation in die extrahepatischen Gewebe zu transportieren.

Über Moleküle aus der Familie der Monocarboxylat-Transporter (MCT) gelangen Ketonkörper sowohl in die Zelle als auch in die Mitochondrien (Halestrap AP, Price NT, 1999). Hier wird D-3-Hydroxybutyrat mit Hilfe der D-3-HBD zu Acetacetat oxidiert (Tab. 1.2). Das gebildete Acetacetat wird dabei durch Veresterung mit Coenzym A aktiviert, das aus Succinyl-CoA, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, stammt. Die Übertragungsreaktion wird von der 3-Ketosaure-CoA-Transferase katalysiert (Tab. 1.2). Acetacetyl-CoA wird durch die Acetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT) in Acetyl-CoA gespalten, das mit Oxalacetat kondensiert und so den Citratzyklus speist. Im Citratzyklus werden Reduktionsäquivalente gebildet, die für die Bildung von ATP an der Atmungskette eingesetzt werden.

Tab. 1.2: Die an der Ketolyse beteiligten Enzyme. Die Reaktionen hierzu finden in der mitochondrialen Matrix statt.

Reaktion	Enzym
$D\text{-}3\text{-HB} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Acetacetat} + \text{NAD}^+$	D-3-HBD ¹⁾
$\text{AA}^{2)} + \text{Succinyl-CoA} \rightarrow \text{AA-CoA} + \text{Succinat}$	3-Ketosäure-CoA-Transferase ³⁾
$\text{Acetoacetyl-CoA} + \text{CoA} \rightarrow 2 \text{ Acetyl-CoA}$	Acetyl-CoA-Acetyltransferase ⁴⁾

¹⁾ D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase; ²⁾ Acetacetat; ³⁾ wird auch als Succinyl-CoA-CoA-Transferase 1 (SCOT) oder 3-Oxoacyl-CoA-Transferase (OCAT) bezeichnet; ⁴⁾ wird auch als Acetoacetyl-CoA-Thiolase bezeichnet.

1.5 Ziele

Ketonkörper stellen hochenergetische Verbindungen dar, deren Nichtnutzung sicherlich einen erheblichen Nachteil für die Zelle bedeutet. Die Verstoffwechslung von Ketonkörper erfordert eine ausreichende Versorgung der Zelle mit Sauerstoff. Andererseits sind Tumoren aufgrund starker Schwankungen bei der Versorgung mit Sauerstoff auf Glukose angewiesen, da diese auch bei Sauerstoffmangel verstoffwechselt wird. Darüber hinaus sind Tumoren in der Lage, energiereiche Substrate wie Glutamin, Fettsäuren und Ketonkörper zu nutzen, deren Verstoffwechslung eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff voraussetzt. (Kallinowski F et al., 1988, 1989; Vaupel P et al., 1989).

Eine ketogene Ernährung zur Induktion einer systemischen Ketose wird bereits seit 1921 sehr erfolgreich zur Prävention bzw. Therapie von Epilepsien bei Kindern angewandt (Wilder R, 1921; Freeman JM et al., 2007). Auch Erkrankungen des zerebralen Energiestoffwechsels wie ein Defekt im Glukosetransporter-1, ein Mangel an Pyruvatdehydrogenase oder neurologische Erkrankungen wie Alzheimer⁹⁾ lassen sich mit einer ketogenen Diät positiv beeinflussen (McNally MA, Hartman AL, 2012; Stafstrom CE, Rho JM, 2012).

Der supportive Nutzen von Ketonkörper für Krebspatienten wird kontrovers diskutiert (Bonuccelli G et al., 2010; Holm E, Kämmerer U, 2011). So ist z.B. nicht

⁹⁾ Newport M. Alzheimer vorbeugen & behandeln. VAK Verlags GmbH, 2012 (ISBN: 978-3-86731-112-0).

geklärt, ob Ketonkörper das maligne Wachstum stimulieren (Bonuccelli G et al., 2010) oder hemmen (Magee BA et al., 1979; Fine EJ et al., 2009; Skinner R et al., 2009). Eine Erklärung für die Unfähigkeit von Krebszellen, auch bei adäquater Oxygenierung Ketonkörper zu verstoffwechseln, stellt der Verlust der für die Ketolyse wichtigen Enzyme (Tab. 1.2) dar (Tisdale MJ et al., 1983; Sawei M et al., 2004). Es gilt aber als sicher, dass Krebszellen in aller Regel über funktionelle Mitochondrien verfügen (Wallace DC, 2012). Um eine solche Enzym-Defizienz für die in dieser Arbeit untersuchten gastrointestinalen Karzinomzelllinien auszuschließen, wurde bei ihnen die Expression der an der Ketolyse beteiligten Enzyme (Tab. 1.2) und von D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase untersucht.

Die Verstoffwechslung von Ketonkörper erfordert die Anwesenheit von Sauerstoff, weshalb in der vorliegenden Arbeit verschiedene Sauerstoffkonzentrationen getestet wurden. Untersuchungen zum Stoffwechsel von Tumorzellen werden *in vitro* in aller Regel bei einer Sauerstoffkonzentration von 21 % durchgeführt, obgleich die meisten Gewebe eine physiologische Sauerstoffkonzentration zwischen 2 % und 11 % aufweisen. In Tumorgeweben sind Sauerstoffkonzentrationen von weniger als 2 % eher die Regel als die Ausnahme (Vaupel P, Mayer A, 2007; Bertourt JA et al., 2008; Solaini G et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Verstoffwechslung von Ketonkörper bei Sauerstoffkonzentrationen von 21 %, 5 % und 1 % untersucht.

Eine der ersten Arbeiten, die sich experimentell mit den Auswirkungen von Ketonkörper auf das Wachstum von Tumorzellen *in vitro* beschäftigte, kam aus Australien. Die Autoren wiesen eine von der Ketonkörperkonzentration abhängige Hemmung des Zellwachstums nach (Magee BA et al., 1979). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Ketonkörper (0,25, 4,0, 8,0 und 20 mmol/l) auf das Zellwachstum etablierter humaner Karzinomzelllinien des Gastrointestinaltrakts untersucht. Diese Konzentrationen an Ketonkörper entsprechen verschiedenen physiologischen Situationen beim Menschen (Tab. 3.3).

2 Fragen

Mit den zur Verfügung stehenden Informationen ist nicht abschließend zu beurteilen, ob Tumoren tatsächlich unfähig sind, Ketonkörper zu verstoffwechseln. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Einfluss von Ketonkörper auf Proliferation und Stoffwechsel etablierter Karzinomzelllinien des Gastrointestinaltrakts zu untersuchen. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat (D-3-HB) eingesetzt. Bei D-3-HB handelt es sich um den im menschlichen Blut am häufigsten vorkommenden Ketonkörper. Auch die Bedeutung von Sauerstoff für die Verwertung von Ketonkörper wurde untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Ketonkörper stellen energiereiche Verbindungen dar, die bei ausreichender Versorgung mit Sauerstoff in den Mitochondrien oxidativ verstoffwechselt werden (Vaupel P et al., 1989). Beeinflussen unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) die Verstoffwechslung von Ketonkörper?
- 2) Frühere Arbeiten belegen einen inhibierenden Effekt von Ketonkörper auf die Proliferation von Krebszellen (Magee BA et al., 1979; Skinner R et al., 2009). Hierbei wurden sehr hohe Konzentrationen an Ketonkörper (> 10 mmol/l) eingesetzt. Wie wirken sich physiologisch relevante Konzentrationen an Ketonkörper auf die Proliferation von Zellen gastrointestinaler Karzinomzelllinien aus?
- 3) Nach Randle beeinflussen sich die Stoffwechselwege von freien Fettsäuren und Glukose gegenseitig; dies gilt ebenfalls für Ketonkörper und Glukose (Randle PJ et al., 1963). Ist ein möglicher Einfluss von Ketonkörper auf die Glykolyse hinsichtlich Glukoseverbrauch und Laktatbildung nachweisbar?
- 4) Zur Verstoffwechslung von Ketonkörper benötigen die Zellen die beiden an der Ketolyse beteiligten Enzyme 3-Ketosäure-CoA-Transferase und Acetyl-CoA-Acetyltransferase (Tab. 1.2). Ist die Expression dieser beiden Enzyme in den untersuchten humanen Karzinomzelllinien nachzuweisen?

3 Material und Methoden

3.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit untersuchten sechs Tumorzelllinien sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Sämtliche Zellen wuchsen adhärent und waren frei von Mycoplasmen. Kontrollzellen waren *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) der Firma PromoCell GmbH, Heidelberg. Alle Zelllinien wurden in einem CO₂-Inkubator (NuAire Inc., Plymouth, U.S.A.) bei Standardbedingungen von 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) kultiviert. In regelmäßigen Abständen (1 bis 2-mal pro Woche) wurde das Kulturmedium ausgetauscht bzw. die Zellen „passagiert“ (s. hierzu Zellernte).

Tab. 3.1: Übersicht der untersuchten humanen Zelllinien.

Zelllinie	Gewebe / Organ	Bezugsquelle
23132/87 ¹⁾	Magen	DSMZ Nr: ACC 201
CaCo2	Kolon	DSMZ Nr: ACC 169
HCT116	Kolon	ATCC Nr: CCL-247
HT29	Kolon	ATCC Nr: HTB-38
SW620	Kolon	ATCC Nr: CCL-227
WiDr	Kolon	ATCC Nr: CCL-218
HUVEC	Endothel	PromoCell Nr: C-12350

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (www.dsmz.de); ATCC: American Type Culture Collection (www.atcc.org); PromoCell (www.promocell.com).

¹⁾ Vollmers HP et al., 1993.

3.2 Zellernte

Die Zellen wurden mit Trypsin / EDTA (0,5 % / 0,22 % in PBS) (PAA Laboratories GmbH, Österreich) vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, mit 50 mL PBS aufgenommen und für 6 Minuten bei 397 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in einem definierten Volumen PBS resuspendiert und

anschließend die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit 0,04 % (Endkonzentration) Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gefärbt.

3.3 Kulturmedien

Die Zellen der einzelnen Zelllinien wurden in den empfohlenen Medien kultiviert (Tab. 3.2). Sämtliche Medien enthielten folgende Zusätze (in Klammern jeweils die Endkonzentration): Penicillin G (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/l), 1 mmol/l Natriumpyruvat, 2 mmol/l Glutamin, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (alle Zusätze von Invitrogen GmbH, Karlsruhe) sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Cell Concepts GmbH, Umkirch). Zur Kultivierung humaner Endothelzellen (HUVEC) wurde ein optimiertes Medium vom PromoCell (*Endothelial Cell Growth Medium*) mit 2,0 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS), 0,1 ng/ml *Epidermal Growth Factor* (EGF, human, rekombinant), 1 ng/ml *Basic Fibroblast Growth Factor* (human, rekombinant), 90 µg/ml Heparin, 1,0 µg/ml Hydrocortison und *Endothelial Cell Growth Supplement* mit nicht näher bezeichneten Inhaltsstoffen verwendet.

Tab. 3.2: Übersicht der verwendeten Kulturmedien. Angegeben sind der Energieträger und seine entsprechende Konzentration im Medium. Die angegebenen Medien werden für die Kultivierung der entsprechenden Zelllinien empfohlen.

Zelllinie	Medium	Energieträger
23132/87 ¹⁾	RPMI 1640 ²⁾	D-Glukose (11 mmol/l)
CaCo2	RPMI 1640	D-Glukose (11 mmol/l)
HCT116	Mc Coy ³⁾	D-Glukose (17 mmol/l)
HT29	Mc Coy	D-Glukose (17 mmol/l)
SW620	Leibovitz L-15 ⁴⁾	D-Galaktose (5 mmol/l)
WiDr	DMEM <i>high glucose</i> ⁵⁾	D-Glukose (25 mmol/l)
HUVEC	<i>Endothelial Cell Media</i> ⁶⁾	D-Glukose (7,8 mmol/l)

¹⁾ Vollmers HP et al., 1993; ²⁻⁴⁾ Gibco Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe; ⁵⁾ CellConcepts, Freiburg; ⁶⁾ PromoCell GmbH, Heidelberg

3.4 Experimentelles Design

Jeweils $1,5 \times 10^4$ Zellen wurden pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen in einem Endvolumen von jeweils $200 \mu\text{l}$ ausgesät. Von jeder Ketonkörper-Verdünnung wurden bis zu 6 Parallelwerte gemessen und, falls möglich, 2 bis 3 unabhängige Versuchswiederholungen durchgeführt. Nach Verteilung der Zellen auf die Zellkulturschalen wurden diese für 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ketonkörper zugegeben und die Zellen für weitere 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden inkubiert. Um Aussagen zur Entwicklung der Zellzahl machen zu können, wurde die Zellvitalität vor Zugabe der Ketonkörper bestimmt. Der für diese Aussaatkontrolle gemessene OD-Wert war der Referenzwert für die gesamte Messung (Abb. 3.1).

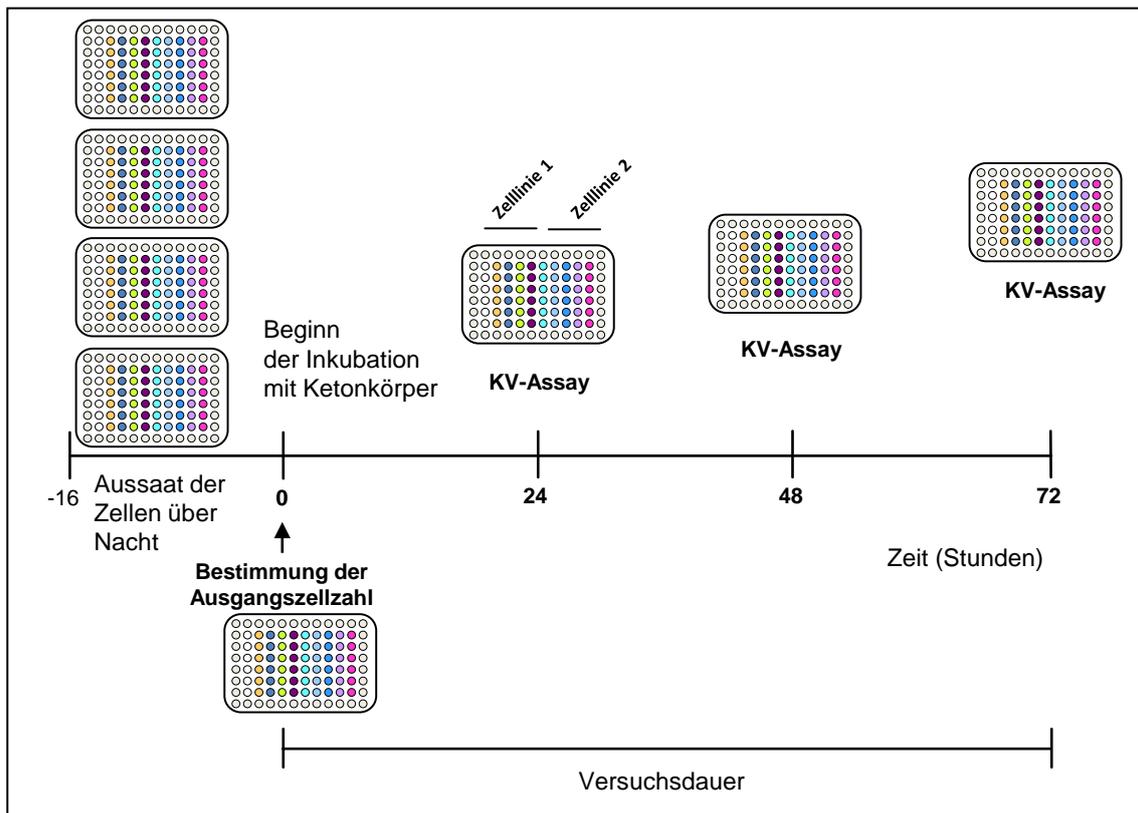


Abb. 3.1: Versuchsaufbau zum Nachweis proliferationsfördernder Eigenschaften von Ketonkörper. Die Anzahl vitaler Zellen wurde 24-, 48- bzw. 72-Stunden nach Beginn der Inkubation mit Ketonkörper im Kristallviolett-Assay bestimmt. Hierzu wurde die Zellzahl zu Beginn der Inkubation mit Ketonkörper bestimmt (= Ausgangszellzahl).

3.5 Ketonkörper

Vier Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat (als Natriumsalz) und als Säure (beide Substanzen von Sigma Aldrich, Taufkirchen) wurden getestet: 0,25 mmol/l, 4 mmol/l, 8 mmol/l und 20 mmol/l¹⁰⁾. Mit diesen Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat wurden die Zellen bis zu 72 Stunden inkubiert; die Zellproliferation wurde nach 24, 48 und 72 Stunden im Kristallviolett-Assay bestimmt.

Tab. 3.3: Ketonkörperspiegel und die entsprechende Stoffwechselsituation¹⁾. Die in dieser Arbeit untersuchten Ketonkörperkonzentrationen entsprechen bestimmten Stoffwechselsituationen.

Konzentration (mmol/l)	Stoffwechselsituation
0,25	Normalsituation
4,0	ketogene Diät, Hungerzustand
8,0	fortgeschrittene schwere Nahrungsrestriktion
20	Ketoazidose

¹⁾ Laffel L, 1999; VanItallie TB, Nufert TH, 2003; Veech RL, 2004.

3.6 Untersuchungen bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Die Wirkung der Ketonkörper auf die Vitalität von Tumorzellen wurde bei einer Sauerstoffkonzentration von 21 % (Kontrolle) und zusätzlich bei 5 % und 1 % Sauerstoff untersucht. Für die beiden verringerten Sauerstoffkonzentrationen wurde die Hypoxiekammer (Coy Laboratory Products über Toepffer Laborsysteme, Göppingen) der Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg genutzt.

3.7 Kristallviolett-Assay

Messprinzip: Der Nachweis vitaler Zellen wurde kolorimetrisch mit Kristallviolett (Triphenylmethan) durchgeführt. Das Prinzip der Färbung beruht darauf, dass Kristallviolett an die DNA fixierter Zellen bindet. Die Menge des gebundenen Kristallvioletts korreliert mit der Anzahl der am Boden verbliebenen Zellen.

¹⁰⁾ Hierbei handelt es sich um Endkonzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat (D-3-HB) im jeweiligen Kulturmedium (Tab. 3.1). Die Stammlösung an D-3-HB (1 mol/l) wurde in PBS angesetzt.

Zellen, die ihre Adhärenz verloren haben, sind avital und werden während der Färbeprozedur mit dem Überstand entfernt (Flick DA, Gifford GE, 1984). Die Farbreaktion wird anschließend in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm quantifiziert (Messung der optischen Dichte).

Durchführung: Zunächst wurde der Überstand aus den Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen abgesaugt und die adhärennten Zellen mit 100 µl Methanol für 10 Minuten fixiert. Danach wurde das Methanol entfernt und die Zellen mit jeweils 100 µl Kristallviolettlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Nicht-gebundener Farbstoff wurde mit Aqua dest. in vier Waschzyklen aus den Vertiefungen der Zellkulturschalen abgespült. Nach dem Trocknen unter dem Abzug wurde in jede Vertiefung der Zellkulturschalen 200 µl 10 % Essigsäure zur Lösung des gebundenen Farbstoffs zugegeben und die Schalen für 25 Minuten auf einen Schüttler gestellt. Abschließend wurde die Farbintensität quantifiziert.

3.8 Bestimmung von Glukose, Laktat und Ketonkörper

Um den Glukoseverbrauch und die Laktatbildung im Zellkulturüberstand zu bestimmen, wurde von jedem Versuchstag Medienproben für die Auswertung entnommen. Aus diesen Proben wurde ebenfalls der Gehalt an Ketonkörper bestimmt.

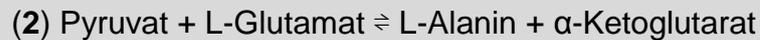
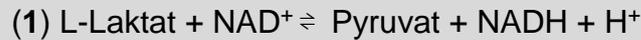
Glukose und Laktat wurden mit dem „Cobas 8000 Modular Analyse“-System (Roche Diagnostics, Mannheim) durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg mit gekoppelten optischen Enzymassays bestimmt (Warburg O, Christian W, Griese A, 1935; Kaplan LA, Pesce AJ, 1989). Hierbei wird die Konzentration an Glukose bzw. Laktat über die Bildung von Reduktionsäquivalenten ($\text{NADH} + \text{H}^+$ bzw. $\text{NADPH} + \text{H}^+$) bei 340 nm bestimmt (Optischer Test nach Warburg):

Glukose: (1) $\text{Glukose} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Glukose-6-Phosphat (G6-P)} + \text{ADP}$

(2) $\text{G6-P} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{Gluconat-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

Die Phosphorylierung von Glukose wird durch die Hexokinase (Reaktion 1) katalysiert und durch das Schlüsselenzym des Pentosephosphatwegs, die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (Reaktion 2), zu Gluconat-6-phosphat oxidiert.

Laktat:



Durch Reaktion 2 wird das Gleichgewicht von Reaktion 1, das auf der Seite von Laktat (katalysiert durch die Laktatdehydrogenase) liegt, mit Hilfe der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) auf die Seite von Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ verschoben. Die Menge an reduziertem NADH ist dabei proportional zur Menge an Laktat. Zur Genauigkeit der Bestimmung von Glukose und Laktat in den verschiedenen Kulturmedien (Tab. 3.2) mit dem Cobas 8000 Modular Analyse System (Roche Diagnostics, Mannheim) siehe Tab. 10.1.

Ketonkörper wurden mit dem „Freestyle Precision β -Ketone“-Messgerät der Firma Abbott und entsprechenden Biosensoren (Sensormessstreifen) bestimmt. Die Messtreifen enthalten das immobilisierte Enzym D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase von *Pseudomonas*, Reduktionsäquivalente in Form von NAD^+ , Phenanthrolinchinon sowie diverse nicht-reaktive Inhaltsstoffe. Kommt die D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase mit D-3-Hydroxybutyrat ($\text{H}_3\text{C-CH(OH)-CH}_2\text{-COO}^-$) in Kontakt, so wird es zu Acetoacetat ($\text{H}_3\text{C-C(=O)-CH}_2\text{-COO}^-$) oxidiert und der Cofaktor NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert. Durch diese enzymkatalysierte Reaktion wird ein elektronisches Signal ausgelöst, das zur Konzentration an D-3-Hydroxybutyrat proportional ist und über einen Verstärker dem Nutzer angezeigt wird.

3.9 Die Reverse Transkription (RT)- quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die **Polymerase-Kettenreaktion** (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine vom amerikanischen Chemiker und Nobelpreisträger Dr. Kary Mullis 1993 entwickelte molekulargenetische Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Die reverse Transkription ist ein molekulargenetischer Vorgang in

RNA-Viren, bei der mit Hilfe der reversen Transkriptase die RNA in DNA umgeschrieben wird. Durch Kombination beider Methoden kann die Aktivität von Genen in Abhängigkeit bestimmter Umweltbedingungen bestimmt werden. Hierzu wird mit der RT-qPCR-Methode der Anteil an spezifischer mRNA quantifiziert.

Die Expression der Enzyme 3-Ketosäure-CoA-Transferase und Acetyl-CoA-Acetyltransferase (Tab. 1.2) sowie von D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (Tab. 1.2) wurde mit einem C-1000 Thermal Cycler von Bio-Rad Laboratories und der CFX96 Software 3.0 bestimmt. Gesamt-RNA wurde mit Trizol aus jeweils einer Millionen Zellen isoliert (Chomczynski P, Sacchi N, 1987) und mit Chloroform aus der phenolischen Phase extrahiert. Nach dem Zentrifugieren bei 16 000 g wurde die wässrige Oberphase abgenommen und die RNA in Isopropanol bei -20°C für mindestens eine halbe Stunde bzw. über Nacht (ca. 18 Stunden) gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13 684 g und 4°C wurde das RNA-Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 45 µl *storage solution* (Ambion) gelöst.

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde mit der lab-on-chip-Technologie über Kapillarelektrophorese (Experion; Bio-Rad) bestimmt. Hierbei wird den RNA-Proben hinsichtlich ihrer Integrität ein Zahlenwert (*relative quality indicator*, RQI) zwischen 1 (stark degradierte RNA) und 10 (intakte RNA) zugewiesen. Für die Untersuchungen wurde ausschließlich qualitativ hochwertige RNA mit einem RQI-Wert von über 8 verwendet. Die RNA-Konzentration wurde bei 260 nm mit einem NanoDrop 2000c Spektralphotometer (Thermo Scientific, NanoDrop Technologies) bestimmt. Ein Mikrogramm Gesamt-RNA wurde für die Erststrang-Komplementär DNA (cDNA)-Synthese mit dem *iScript synthesis kit* von BioRad durchgeführt. Der Kit enthält die RNase H⁺ iScript Reverse Transkriptase, einen RNase Inhibitor und einen optimierten Mix aus Oligo(dT)- und Random-Primern. Die cDNA Synthese wurde in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt. Das Synthese-Protokoll hierzu sah wie folgt aus: 5 Minuten bei 25°C; 30 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 85°C.

Aus der cDNA wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen (1:2,5 bis 1:320) in nukleasefreiem Wasser hergestellt, um folgende Qualitätskriterien der quantitativen PCR entsprechend den MIQE Empfehlungen (Bustin SA et al., 2009) für jedes Primerpaar zu überprüfen: Effizienz (E), Steigung der Standardkurve, Korrelationskoeffizient (R^2) und den Zyklus der Quantifizierung (cycle of quantification oder Cq) für die niedrigste und höchste Verdünnung. Die quantitative PCR wurde mit dem MESA Green qPCR MasterMix (Eurogentec) für SYBR Green in 0.2 ml weißen 8-„tube“-Streifen (Biozym) durchgeführt. Das Kit enthält die MeteorTaq hotstart DNA Polymerase. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes betrug 25 μ l mit 2 μ l 1:10 vorverdünnter cDNA und 200 nmol/L (Endkonzentration) vom entsprechenden Primerpaar. Das Synthese-Protokoll war wie folgt: 5 Minuten bei 95°C (1 Zyklus) gefolgt von 40 Zyklen mit folgendem Temperaturverlauf: 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 60°C; hierbei werden der *Annealing*- und *Elongations*-Schritt bei einer Temperatur durchgeführt. Ein abschließender Extensionsschritt folgte für 5 Minuten bei 72°C.

Die Expression der Enzyme 3-Ketosäure-CoA-Transferase und Acetyl-CoA-Acetyltransferase (Tab. 1.2) sowie von D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (Tab. 1.2) wurde auf die beiden Referenzgene β -Aktin und Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (PPIA) normalisiert und die Expression mit der $\Delta\Delta Cq$ -Methode bestimmt (Pfaffl MW, 2001). Die beiden Referenzgene zeigen eine stabile Expression für die getesteten Zelllinien und wurden aus einer Reihe von Referenzgenen aufgrund ihres M-Werts (Vandesompele J et al., 2002) ausgewählt. Die Schmelzkurven der Amplifikate wurden hinsichtlich möglicher Primerdimer-Artefakte und auf Kontaminationen überprüft. Zusätzlich wurden die aufgereinigten PCR-Produkte sequenziert, um ihre Identität mit der Zielsequenz zu bestätigen (SeqLab Göttingen GmbH, Göttingen, Germany).

Tab. 3.4: Informationen zu den Primer-Paaren. Zur Nomenklatur der an der Ketolyse beteiligten Enzyme siehe auch Tab. 1.2.

Symbol	Zugangs-ID (PubMed)	Größe (bp)	Sequenz (5' → 3')	
D-3-HBD ¹⁾	NM_020139.3	150	For:	TCG CTG CGC TAT GAG ATG TA
			Rev:	CTT GCC GTA GTC CTT GC
SCOT ²⁾	NM_000436.3	133	For:	TGG GAC CCT GGT ACA AGA AG
			Rev:	CCC TGT AAT TGC TTC CTC CA
ACAT1 ³⁾	NM_00019.3	77	For:	CGG CAG ATG CAG CGA AGA GG
			Rev:	AGG TTC TAC AGC AGC GTC AGC A
β-Aktin	NM_001101.3	96	For:	CCT TGC CAT CCT AAA AGC C
			Rev:	CAC GAA AGC AAT GCT ATC AC
PPIA ⁴⁾	NM_021130.3	140	For:	TGT CCA TGG CAA ATG CTG GAC CC
			Rev:	GCG CTC CAT GGC CTC CAC AA

¹⁾ D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase

²⁾ Succinyl-CoA-CoA-Transferase

³⁾ Acetyl-CoA-Acetyltransferase

⁴⁾ Peptidyl-Prolyl-Isomerase A

Tab. 3.5: Übersicht zur Qualität der qPCR. Die gezeigten Daten sind mit der Zelllinie WiDr erhoben und gelten auch für die übrigen Zelllinien (nicht gezeigt). Die Daten sind als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (Stabw) bzw. als 95% Konfidenzintervall („confidence interval“, CI) von jeweils zwei unabhängigen PCR-Läufen mit jeweils 2 Parallelwerten pro Verdünnungsstufe angegeben.

Symbol	Effizienz (95% CI)	Steigung (95% CI)	R ²	Cq (1:2,5) (MW ± Stabw)	Cq (1:320) (MW ± Stabw)
D-3-HBD ¹⁾	97,7 (95,0 - 100,5)	-3,394 (-3,310 / -3,439)	0,998	25,67 ± 0,14	30,75 ± 0,02
SCOT ²⁾	102,0 (99,8 - 103,1)	-3,274 (-3,224 / -3,291)	0,995	21,41 ± 0,39	26,36 ± 0,13
ACAT1 ³⁾	98,7 (97,05 - 100,4)	-3,353 (-3,310 / -3,390)	0,997	22,95 ± 0,11	28,11 ± 0,15
β-Aktin	101,8 (100,5 - 102,5)	-3,273 (-3,267 / -3,279)	0,999	17,03 ± 0,24	22,90 ± 0,14
PPIA ⁴⁾	100,1 (99,9 - 100,7)	-3,303 (-3,301 / -3,304)	0,998	17,31 ± 0,11	23,29 ± 0,19

¹⁾ D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase

²⁾ Succinyl-CoA-CoA-Transferase

³⁾ Acetyl-CoA-Acetyltransferase

⁴⁾ Peptidyl-Prolyl-Isomerase A

3.9 Auswertung und Statistik

Die Ergebnisse zur Zellvitalität (bestimmt mit dem Kristallviolett-Assay) und den Messdaten zum Glukose- und Ketonkörperverbrauch sowie zur Laktatbildung sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung sämtlicher Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism 5 durchgeführt: Mehrfachvergleiche wurden mittels ANOVA und einem geeigneten post hoc-Test analysiert; für den Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney U-Test angewandt. Das Signifikanzniveau P wurde auf 0,05 festgesetzt.

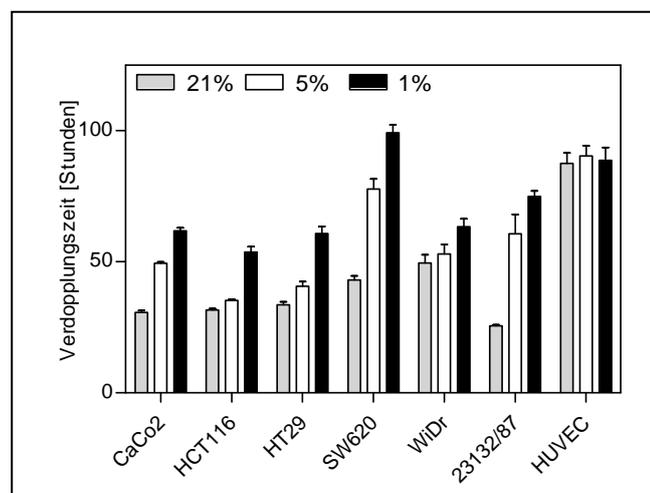
4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zum Einfluss von Ketonkörper auf Proliferation und Stoffwechsel etablierter Karzinomzelllinien des Gastrointestinaltrakts. Die Untersuchungen hierzu wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen an Sauerstoff (21 %, 5 %, 1 %) und D-3-Hydroxybutyrat (0,25, 4, 8, 20 mmol/l) durchgeführt (s. Einleitung).

4.1 Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

Die Verdopplungszeit für das Zellwachstum der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien wurde ermittelt. Bei 21 % Sauerstoff wiesen die Zellen der gastrointestinalen Karzinomzelllinien Verdopplungszeiten zwischen 26 Stunden (23132/87) und 50 Stunden (WiDr) auf, während für HUVEC eine Verdopplungszeit von 88 Stunden errechnet wurde (Abb. 4.1). Bei 5 % Sauerstoff verlängerten sich die Verdopplungszeiten für alle Zelllinien: für WiDr, HCT116 und HT29 um bis zu 21 %, für CaCo2 und SW620 um bis zu 81 % und für 23132/87 um 172 %; die Zellen dieser Zelllinie wuchsen damit am langsamsten. Bei 1 % Sauerstoff verlängerten sich die Verdopplungszeiten noch einmal bei allen Karzinomzelllinien um bis zu 190 % (23132/87). Endotheliale Zellen (HUVEC) wuchsen bei allen drei Sauerstoffkonzentrationen sehr langsam; für sie betrug die Verdopplungszeit ca. 90 Stunden.

Abb. 4.1: Verdopplungszeiten. Zur Bestimmung der Verdopplungszeiten wurden die Zellen in ihrem empfohlenen Medium kultiviert (Tab. 3.2). Die Verdopplungszeit g wurde wie folgt bestimmt: $(\log(2) \times \Delta t) / (\log(N_t) - \log(N_0))$; wobei Δt [in Stunden] die Differenz zwischen Beginn (t_0) und Ende der Kultur (t_n) angibt (sie betrug 48 bzw. 72 Stunden); N_0 die Zellzahl zum Zeitpunkt t_0 (= Aussaat: $1,0 \times 10^4$ Zellen.) und N die Zellzahl zum Zeitpunkt t_n . Die Messwerte (Mittelwert \pm Standardabweichung) basieren auf einer repräsentativen Versuchsserie mit bis zu 6 Parallelwerten (s. auch Tab. 10.3).



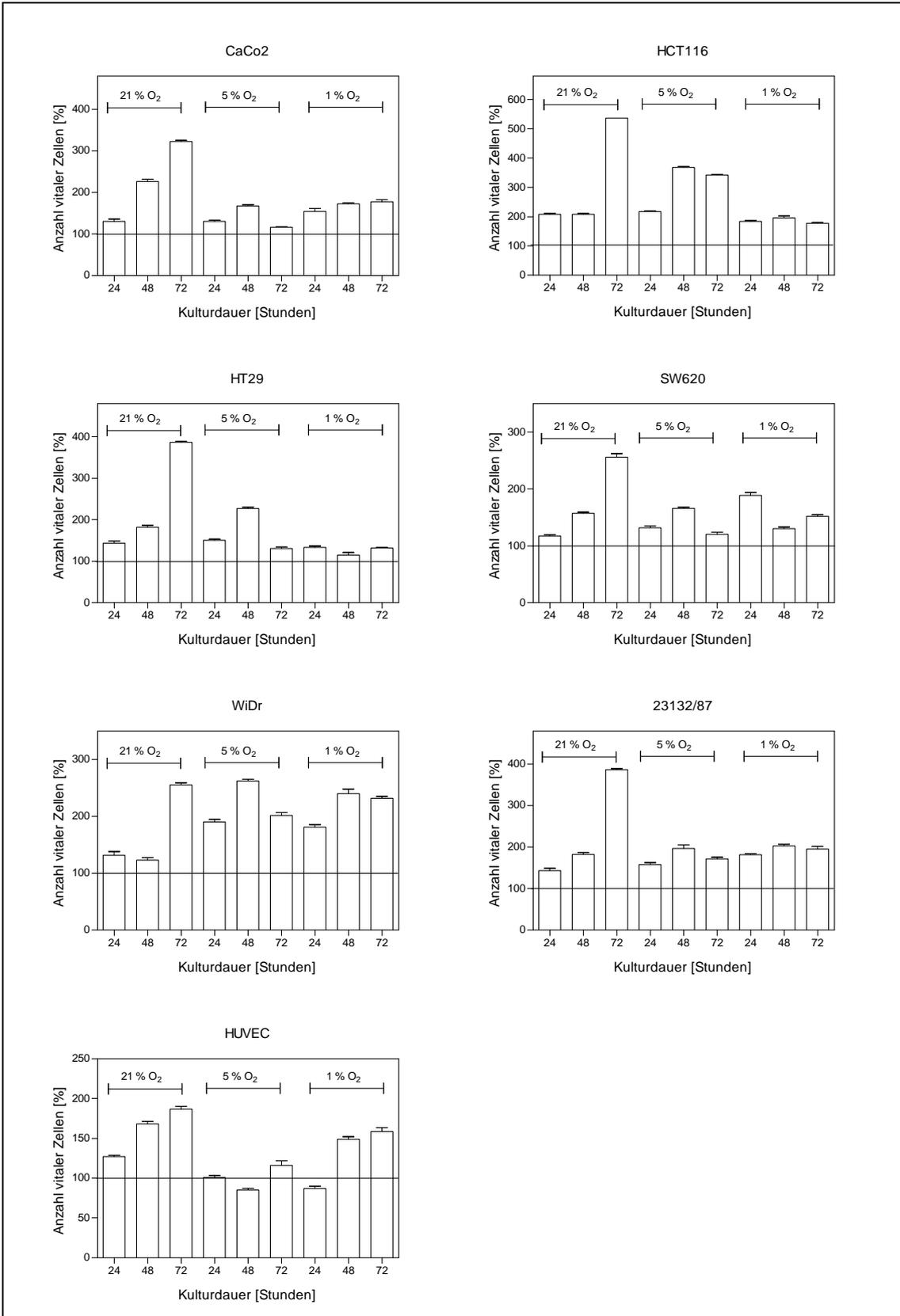


Abb. 4.2 (S. 24): Der Einfluss von Sauerstoff auf das Zellwachstum. Hierzu wurden fünf gastrointestinale Zelllinien (CaCo2, HCT116, HT29, SW620 und WiDr), eine Magenkarzinomzelllinie (23132/87) und Endothelzellen (HUVEC) für 24, 48 und 72 Stunden in ihrem empfohle-

nen Medium (Tab. 3.2) bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff (Kapitel 3.8) kultiviert. Die prozentuale Berechnung der Anzahl vitaler Zellen erfolgte auf die Aussaat (= $1,0 \times 10^4$ Zellen). Die Ausgangszellzahl wird durch die Querlinie markiert.

Da die Verstoffwechslung von Ketonkörper die Anwesenheit von Sauerstoff erfordert, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Sauerstoffkonzentrationen getestet. Dabei werden Untersuchungen zur Stoffwechselleistung von Tumorzellen *in vitro* in aller Regel bei einer Sauerstoffkonzentration von 21 % durchgeführt, obwohl die meisten Gewebe eine physiologische Sauerstoffkonzentration zwischen 2 % und 11 % aufweisen und im Tumorgewebe Sauerstoffkonzentrationen von weniger als 2 % eher die Regel als die Ausnahme darstellen (Einleitung).

Zu den Vitalitätsparameter einer Zellkultur gehören neben der Verdopplungszeit auch die Zellvitalität. Aus diesem Grund wurde auch der Anteil vitaler Zellen bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff ermittelt (Abb. 4.2). Bei 21 % Sauerstoff war das Zellwachstum zwar am stärksten, doch war ein Zellwachstum auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff zu messen gewesen.

4.2 Der Einfluss von Ketonkörper auf das Zellwachstum

In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse zum Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat (D-3-HB) auf die Zunahme vitaler Zellen (= Zellwachstum) bei unterschiedlicher Versorgung mit Sauerstoff gezeigt:

Sauerstoffkonzentration	Abbildung
21 %	Abb. 4.3 (S. 26)
5 %	Abb. 4.4 (S. 28)
1 %	Abb. 4.5 (S. 29)

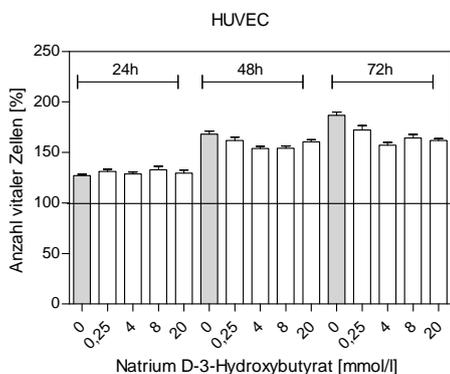
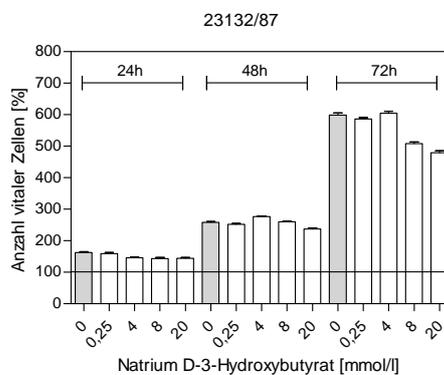
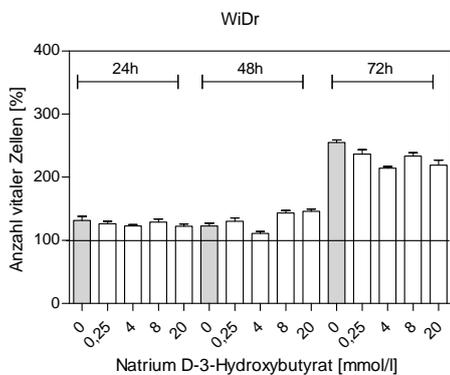
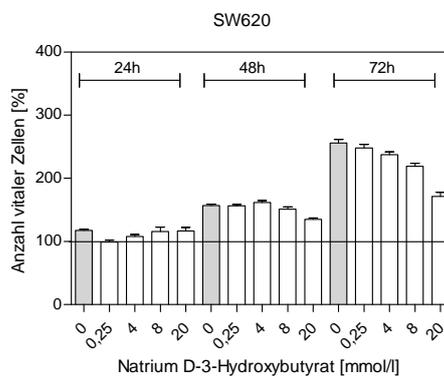
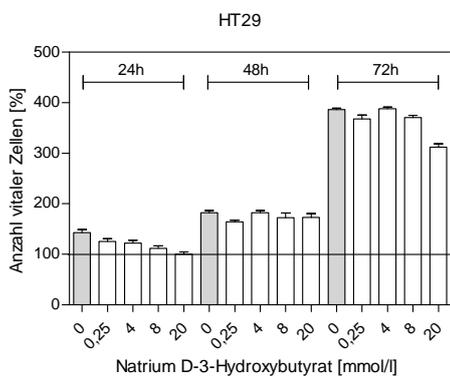
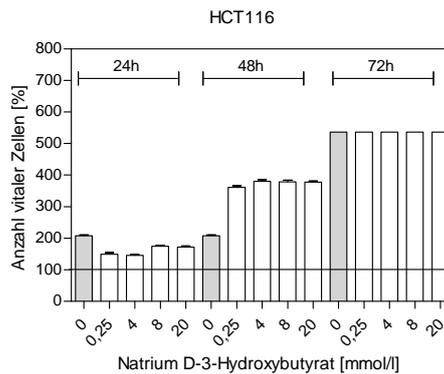
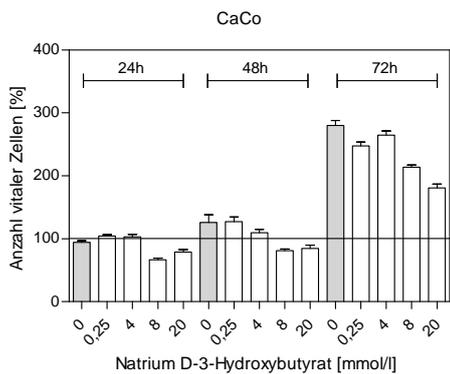


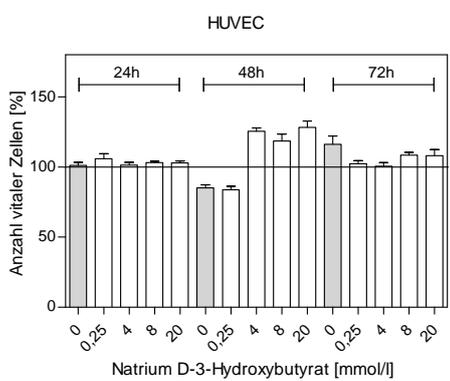
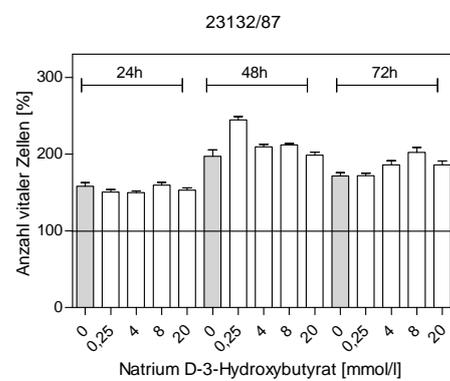
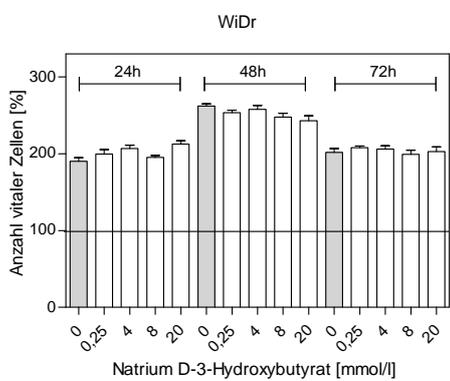
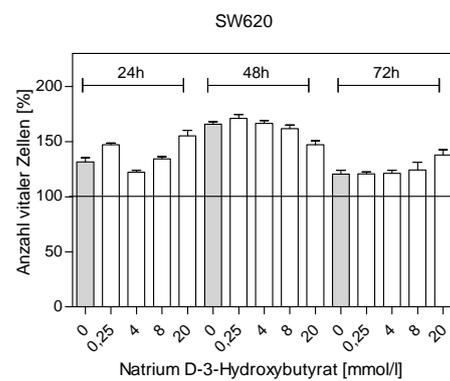
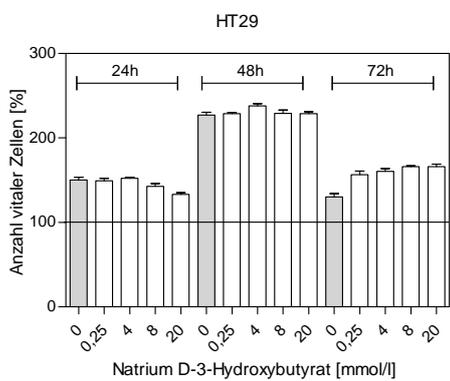
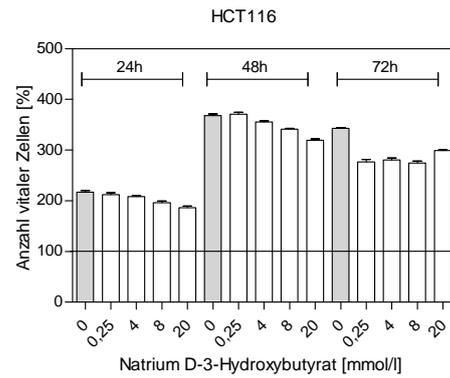
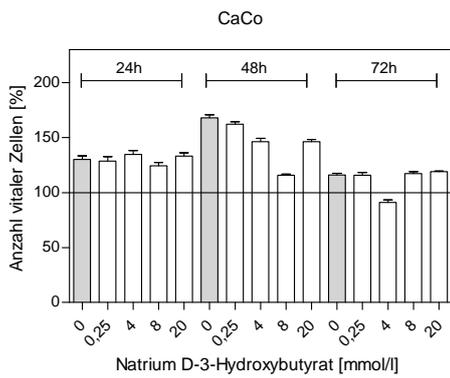
Abb. 4.3 (S. 26): Der Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat auf das Zellwachstum bei 21 % Sauerstoff. Fünf gastrointestinale Zelllinien (CaCo2, HCT116, HT29, SW620 und WiDr), eine Magenkarzinomzelllinie (23132/87) und Endothelzellen (HUVEC) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat (0,25 bis 20 mmol/l) inkubiert. Die Zellen wurden bis zu 72 Stunden in ihrem empfohlenen Medium (Abb. 3.2) inkubiert, und jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellvitalität mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Messwerte (Mittelwert \pm Standardabweichung) basieren auf einer repräsentativen Versuchsserie mit jeweils 6 Parallelwerten pro Konzentration an Ketonkörper.

Ein hemmender Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat auf die Zunahme vitaler Zellen bei einer Versorgung der Kulturen mit 21 % Sauerstoff wurde nicht beobachtet; allenfalls nach 72 Stunden in Kultur und dann auch nur für die Konzentration von 20 mmol/l D-3-Hydroxybutyrat bei den Zelllinien CaCO₂, HT29, SW620 und 23132/87. Die Zunahme vitaler Zellen war um bis zu 35 % vermindert (s. Tab. unten). Auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff waren nur geringe Unterschiede zu beobachten (Abb. 4.4 und 4.5). Hierbei waren stets einzelne Veränderungen innerhalb der Messreihen zu beobachten, nie aber ein eindeutiger Trend. Somit ist nicht zu entscheiden, ob die Unterschiede bei der Anzahl vitaler Zellen tatsächlich einen hemmenden Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat auf die Zellteilung zeigen oder ob es sich hierbei um „triviale“ messtechnische Ausreißer handelt.

In Ergänzung zur Abb. 4.3 (S. 26): Gezeigt ist der Anteil vitaler Zellen (in Prozent) der Karzinomzelllinie CaCo₂ bei unterschiedlichen Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat für eine Inkubationsdauer von 72 Stunden (Mittelwert \pm Standardabweichung); in Klammern ist der Unterschied in der Anzahl vitaler Zellen zur Kontrolle (keine Ketonkörper) berechnet:

D-3-Hydroxybutyrat (mmol/l)				
0	0,25	4	8	20
280 \pm 19,2	247 \pm 15,3 (12%)	265 \pm 15,7 (5%)	214 \pm 7,9 (24%)	181 \pm 14,4 (35%)

Abb. 4.4 (S. 28): Der Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat auf das Zellwachstum bei 5 % Sauerstoff. Fünf gastrointestinale Zelllinien (CaCo₂, HCT116, HT29, SW620 und WiDr), eine Magenkarzinomzelllinie (23132/87) und Endothelzellen (HUVEC) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat (0,25 bis 20 mmol/l) inkubiert. Die Zellen wurden bis zu 72 Stunden in ihrem empfohlenen Medium (Abb. 3.2) inkubiert, und jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellvitalität mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Messwerte (Mittelwert \pm Standardabweichung) basieren auf einer repräsentativen Versuchsserie mit jeweils 6 Parallelwerten pro Konzentration an Ketonkörper.



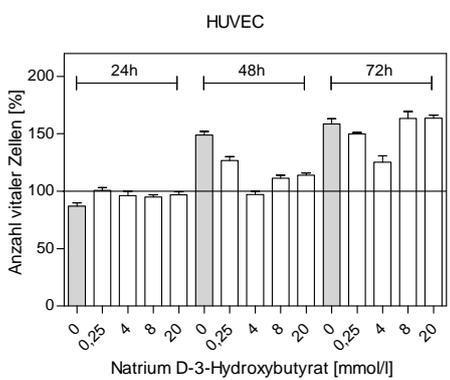
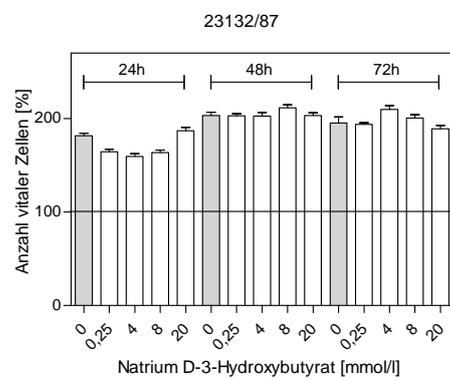
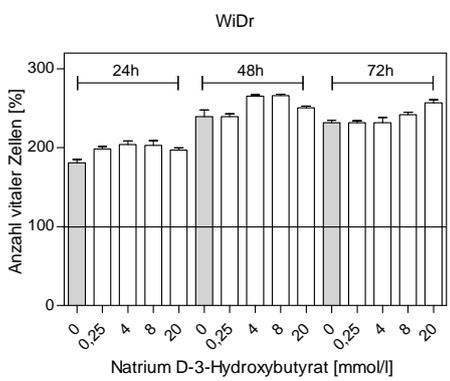
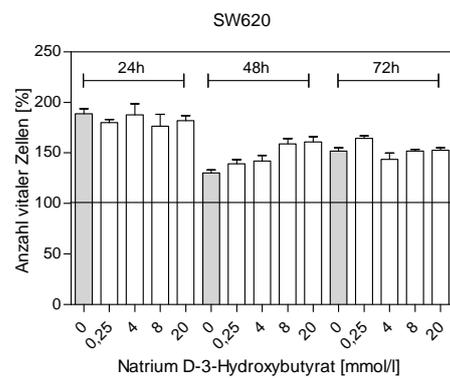
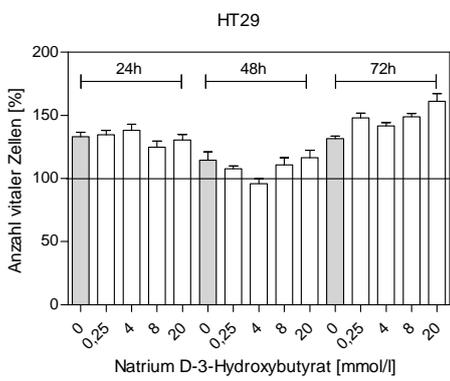
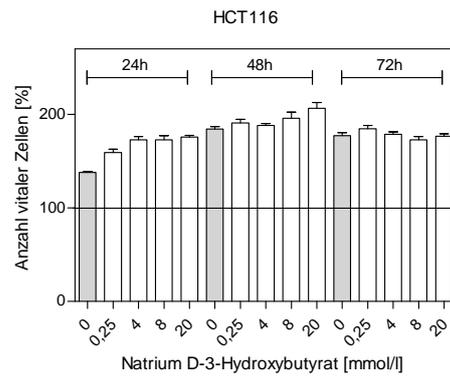
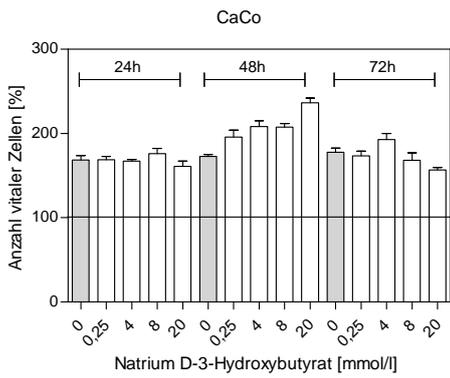


Abb. 4.5 (S. 29): Der Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat auf das Zellwachstum bei 1 % Sauerstoff. Fünf gastrointestinale Zelllinien (CaCo2, HCT116, HT29, SW620 und WiDr), eine Magenkarzinomzelllinie (23132/87) und Endothelzellen (HUVEC) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat (0,25 bis 20 mmol/l) inkubiert. Die Zellen wurden bis zu 72 Stunden in ihrem empfohlenen Medium (Abb. 3.2) inkubiert, und jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellvitalität mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Messwerte (Mittelwert \pm Standardabweichung) basieren auf einer repräsentativen Versuchsserie mit jeweils 6 Parallelwerten pro Konzentration an Ketonkörper.

Untersuchungen zur möglichen Beeinflussung der Anzahl vitaler Zellen durch D-3-Hydroxybutyrat wurden aus dem Grund auch bei 5 % Sauerstoff durchgeführt, da die physiologische Sauerstoffkonzentration in Geweben zwischen 2 % und 11 % liegt. Zum Vergleich: in Tumorgewebe sind Sauerstoffkonzentrationen von weniger als 2 % eher die Regel als die Ausnahme.

Wie bereits oben erwähnt, war ein möglicher Einfluss von Ketonkörper auf die Zunahme vitaler Zellen bei 5 % und 1 % nur sehr gering und ein eindeutiger Trend wurde nicht beobachtet (Abb. 4.4 und 4.5).

Weitere Ergebnisse zur möglichen Beeinflussung des Zellwachstums durch Ketonkörper:

Abbildung	Thema
Abb. 10.1 (S. 60)	Ketonkörper und Zellwachstum bei 21 % O ₂
Abb. 10.2 (S. 61)	Ketonkörper und Zellwachstum bei 1 % O ₂
Abb. 10.8 (S. 68)	Ketonkörper und Zellwachstum bei 21 % O ₂ ¹⁾

1) Für diese Untersuchungen wurde nicht das Natriumsalz, sondern die Säure verwendet.

4.3 Untersuchungen zur Verstoffwechslung von Ketonkörper

In den nachfolgenden Abbildungen werden Ergebnisse zur Verstoffwechslung von D-3-Hydroxybutyrat durch humane Karzinomzelllinien gezeigt.

Abbildung	Thema
Abb. 4.6 (S. 32)	Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 21 % O ₂
Abb. 4.7 (S. 33)	Kontrollversuch-1 mit fixierten Zellen
Abb. 4.8 (S. 34)	Kontrollversuch-2 mit zellfreien Kulturen
Abb. 4.9 (S. 34)	Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 5 % und 1 % O ₂
Abb. 10.7 (S. 67) ¹⁾	Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 21 % O ₂ ¹⁾

¹⁾ Abb. 10.7 ist im Anhang zu finden. Die Untersuchungen hierzu wurden bei einem begrenzten Glukoseangebot von 2 mmol/l durchgeführt.

Ebenfalls für die Beurteilung der Daten von Bedeutung ist folgendes Kontrollexperiment (Appendix):

Abbildung	Thema
Abb. 10.2 (S. 58)	Überprüfung Messgenauigkeit der Sensorstreifen

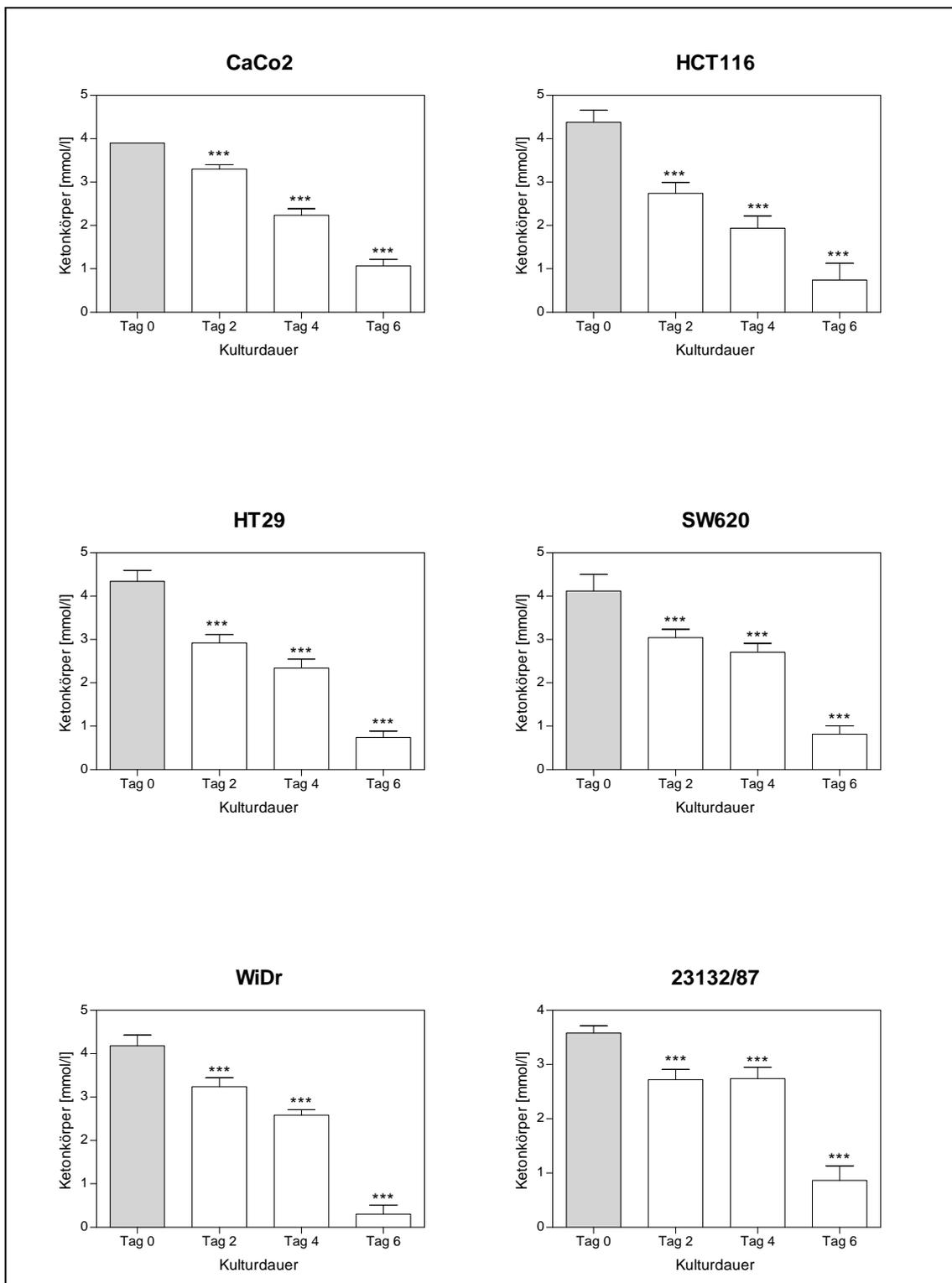


Abb. 4.6: Nachweis der Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 21 % Sauerstoff. Die Kulturen wurden mit 4 mmol/l Natrium D-3-Hydroxybutyrat (Endkonzentration) versetzt und alle zwei Tage der Anteil an Ketonkörper im Zellkulturüberstand bestimmt. Jede Messung wurde 2-mal durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Für diese Messungen wurden die Zellen in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 11 mmol/l Glukose kultiviert (Tab. 3.2). *** P<0.001, ANOVA mit Benferroni-Korrektur.

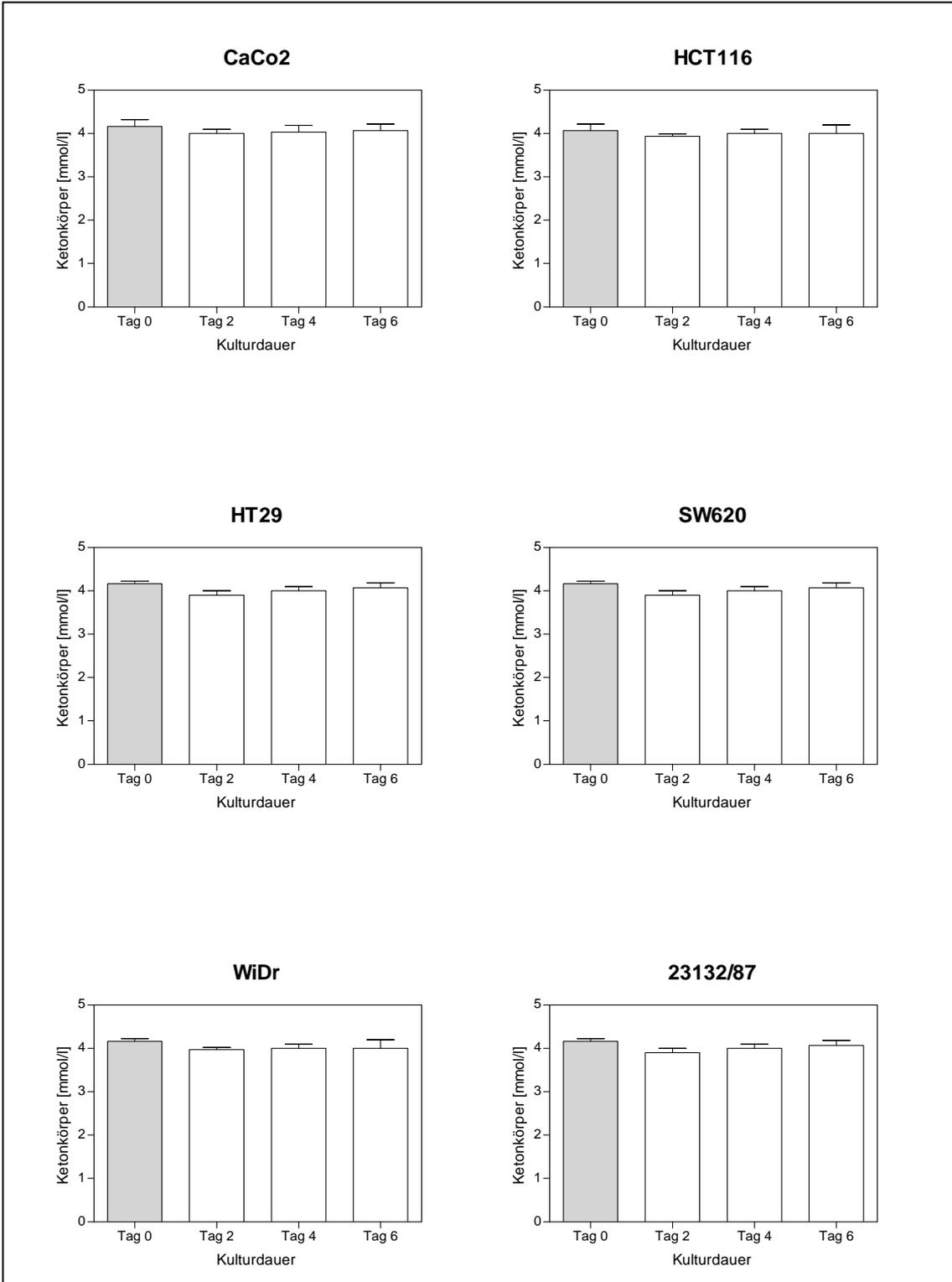
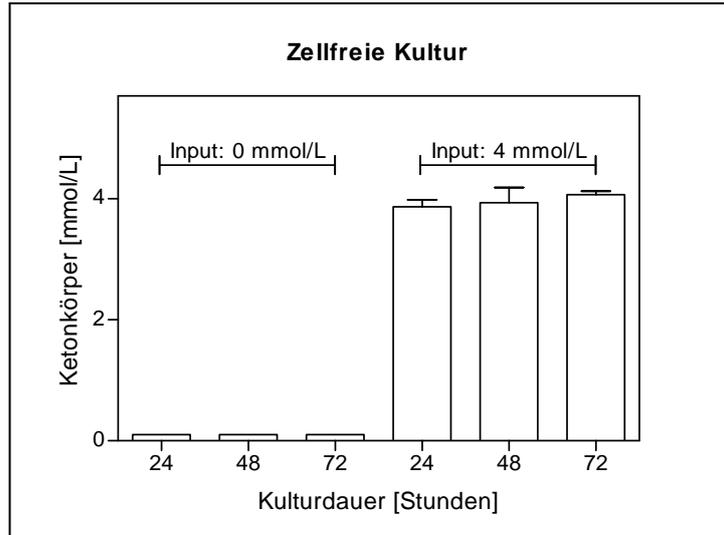


Abb. 4.7: Nachweis der Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 21 % Sauerstoff. Kontrollversuch-1 mit fixierten Zellen. Zellen in Kultur wurden für 3 Minuten mit 4 % Formalin fixiert und 3-mal mit PBS vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde D-3-Hydroxybutyrat in einer Endkonzentration von 4 mmol/l in RPMI 1640 mit 10 % FCS zu den Kulturen gegeben und alle zwei Tage die Konzentration an Ketonkörper im Zellkulturüberstand bestimmt. Jede Messung wurde 2-mal durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung (Tab. 3.2).

Abb. 4.8: Nachweis der Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 21 % Sauerstoff. Kontrollversuch-2 mit zellfreien Kulturen. Zellfreie Kulturen (RPMI 1640 mit 10 % FCS) wurden mit und ohne D-3-Hydroxybutyrat (Endkonzentration 4 mmol/l) inkubiert, um die Messgenauigkeit der Biosensoren (Sensormessstreifen) des Freestyle Precision β -Ketone Messgerät der Firma Abbott für die Anwendung an Zellkulturüberständen zu überprüfen. Zusätzlich wurde mit diesem Versuch die Stabilität von D-3-Hydroxybutyrat in Zellkulturen überprüft.



Eine Abnahme von D-3-Hydroxybutyrat im Zellkulturüberstand war nur dann zu beobachten, wenn (1) die Kulturen ausreichend mit Sauerstoff versorgt waren (hierzu wurde die unphysiologische Sauerstoffkonzentration von 21 % als Referenz gewählt) und (2) sich vitale Zellen in den Kulturflaschen befanden.

Die Ergebnisse dieses Kapitels lassen sich dahingehend interpretieren, dass Karzinomzellen tatsächlich über die Fähigkeit verfügen, Ketonkörper oxidativ zu verstoffwechseln.

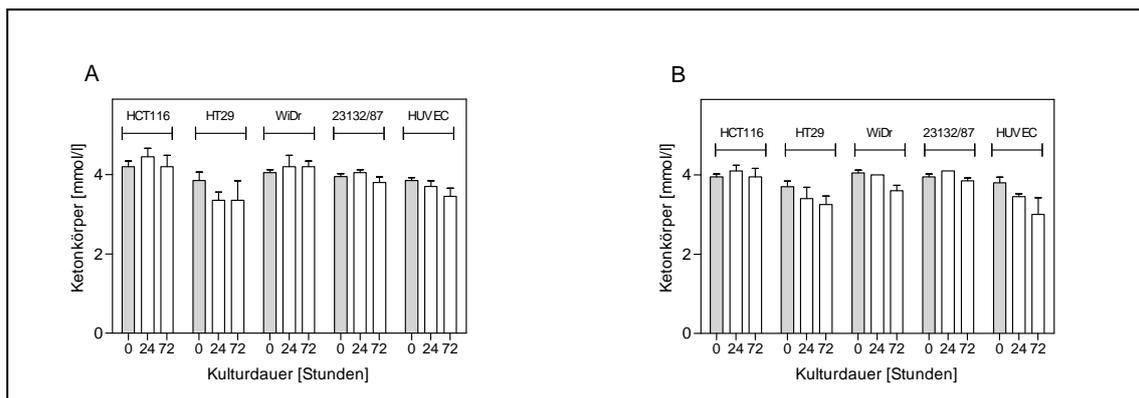


Abb. 4.9: Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 5 % (A) und 1 % (B) Sauerstoff. Die Kulturen (Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen) wurden mit 4 mmol/l Natrium D-3-Hydroxybutyrat (Endkonzentration) versetzt, und nach 24 und 72 Stunden wurde der Anteil an Ketonkörper im Zellkulturüberstand bestimmt. Jede Messung wurde 2-mal durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Für diese Messungen wurden die Zellen in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 11 mmol/l Glukose kultiviert (Tab. 3.2). Die Unterschiede sind nicht signifikant.

4.4 Glukoseverbrauch und Laktatbildung

Um zu überprüfen, ob 3-D-Hydroxybutyrat die Glykolyse beeinflusst, was den inhibitorischen Effekt der Ketonkörper erklären würde (Maggee BA et al., 1979), wurde der Glukoseverbrauch und die Laktatbildung gemessen. Hierzu wurden für jede Ketonkörperkonzentration Proben aus den Proliferationsassays entnommen. Die Konzentrationen an Glukose und Laktat wurden durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg bestimmt (Kapitel 3.8).

In Tab. 10.1, S. 58, ist das Messprotokoll zur Prüfung der Messgenauigkeit des Cobas 8000 Modular Analyse System für Kulturüberstände mit 10 % FCS aufgeführt. Die Daten belegen, dass die Abweichungen bei der Bestimmung von Glukose und Laktat in Kulturmedien unter 10 % liegen.

Abbildungen	Thema
Abb. 4.10 (S. 36)	Ketonkörper und Glukoseverbrauch bei 1 % O ₂
Abb. 4.11 (S. 37)	Ketonkörper und Laktatbildung bei 1 % O ₂
Abb. 10.3 (S. 62) ¹⁾	Ketonkörper und Glukoseverbrauch bei 5 % O ₂
Abb. 10.4 (S. 63)	Ketonkörper und Glukoseverbrauch bei 21 % O ₂
Abb. 10.5 (S. 64)	Ketonkörper und Laktatbildung bei 5 % O ₂
Abb. 10.6 (S. 65)	Ketonkörper und Laktatbildung bei 21 % O ₂

¹⁾ Abb. 10.3-10.6 sind im Anhang zu finden.

In Tab. 10.4 und Tab. 10.5 sind Messdaten zu Abb. 4.10 für die beiden Karzinomzelllinien HCT116 und WiDr aufgeführt.

Die umfangreichen Messdaten zeigen, dass Ketonkörper weder den Glukoseverbrauch noch die Laktatbildung beeinflussten – und zwar unabhängig von der Ketonkörperkonzentration, der Inkubationsdauer und der Sauerstoffkonzentration. Im Gegensatz dazu war der Einfluss der Inkubationsdauer auf Glukoseverbrauch und Laktatbildung deutlich zu erkennen.

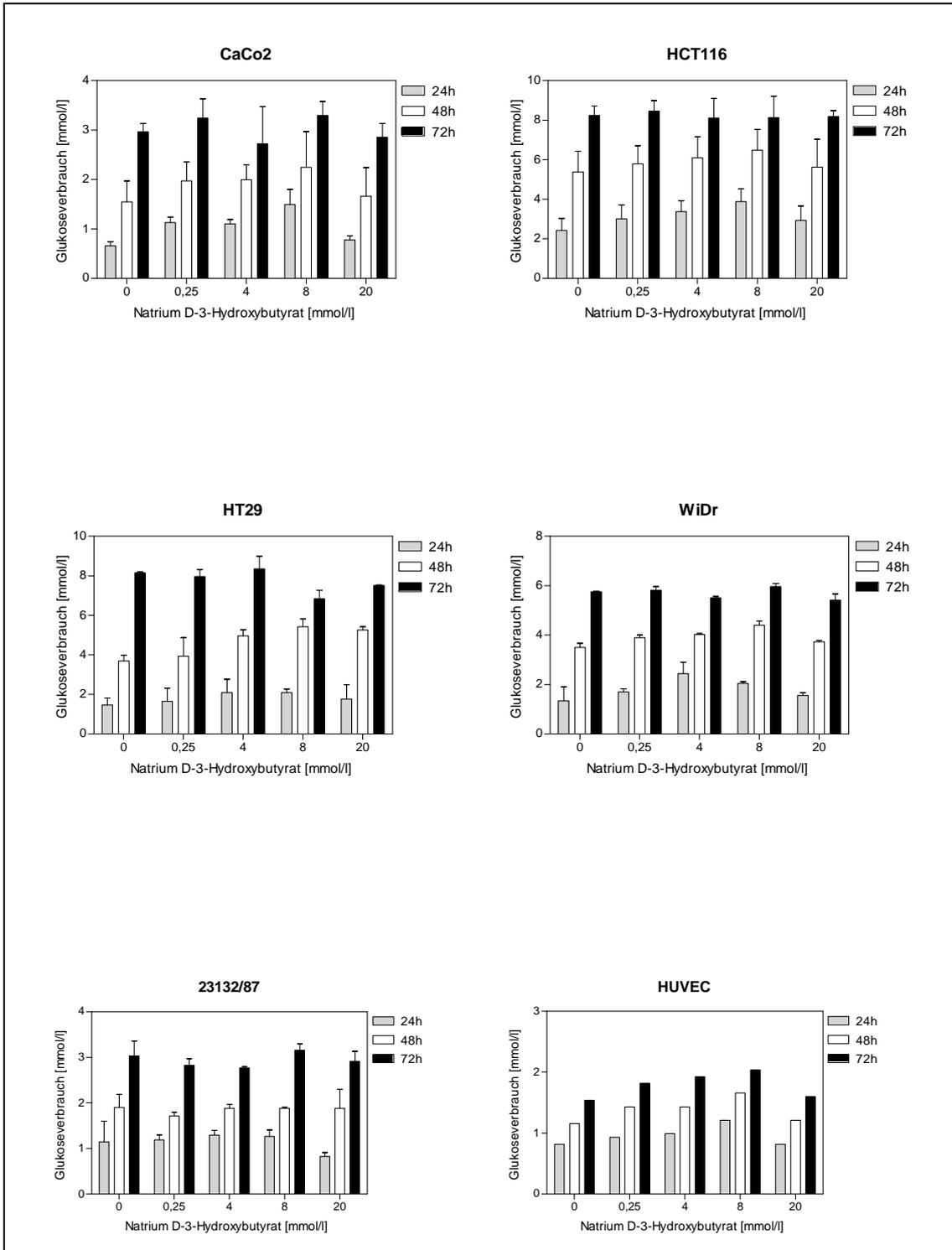


Abb. 4.10: Ketonkörper beeinflussen nicht den Verbrauch von Glukose bei 1 % Sauerstoff. Fünf gastrointestinale Zelllinien (CaCo2, HCT116, HT29, SW620 und WiDr), eine Magenkarzinomzelllinie (23132/87) und Endothelzellen (HUVEC) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat inkubiert. Die Zellen wurden bis zu 72 Stunden in ihrem empfohlenen Medium (Abb. 3.2) kultiviert, und jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellvitalität mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Messwerte (Mittelwert \pm Standardabweichung) basieren auf zwei unabhängigen Versuchsserien mit jeweils 2 Parallelwerten. Die Daten für 5 % und 21 % Sauerstoff befinden sich im Anhang. Die Unterschiede im Glukoseverbrauch zwischen den einzelnen Ketonkörperkonzentrationen sind nicht signifikant.

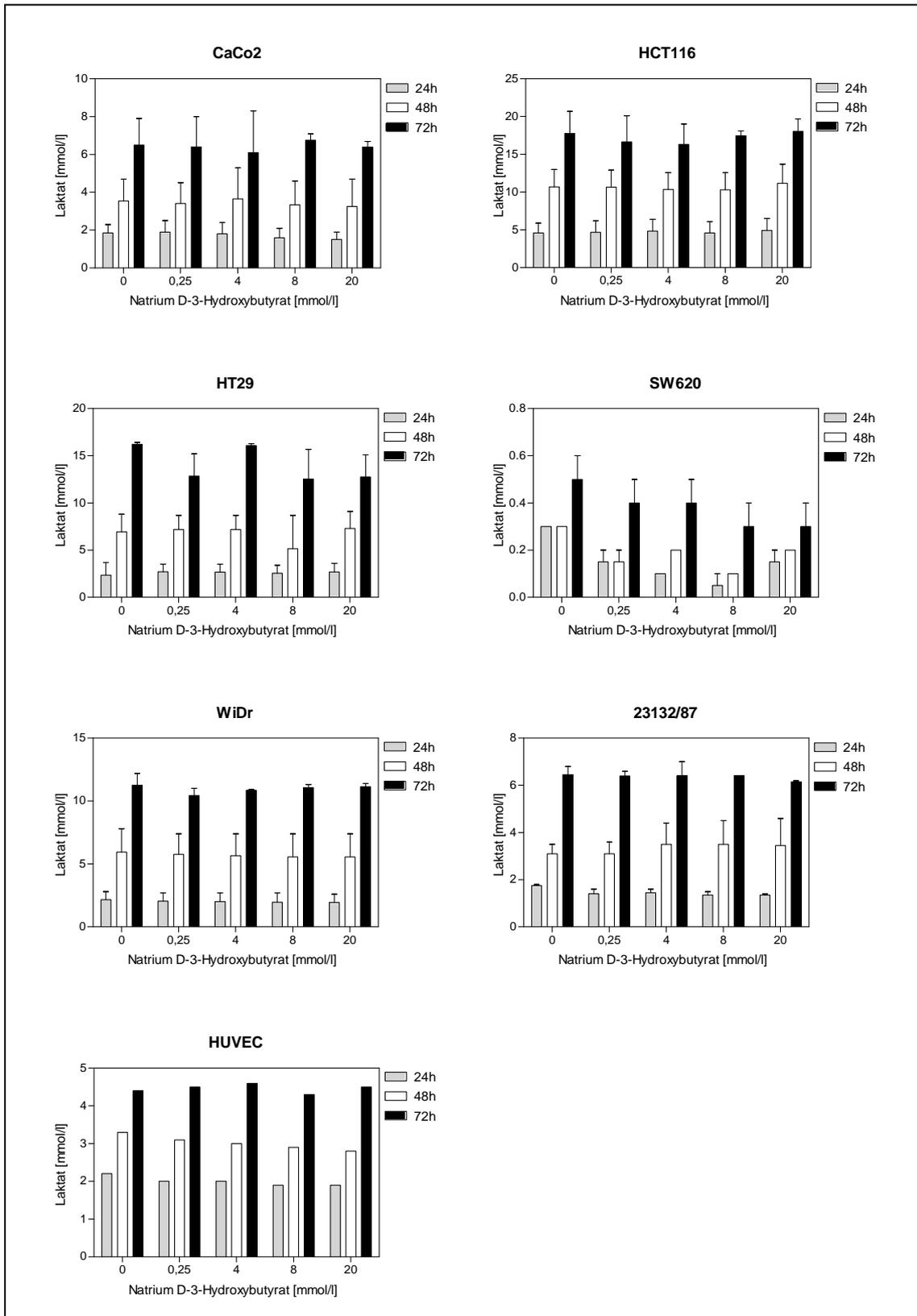


Abb. 4.11: Ketonkörper beeinflussen nicht die Bildung von Laktat bei 1 % Sauerstoff. Fünf gastrointestinale Zelllinien (CaCo2, HCT116, HT29, SW620 und WiDr), eine Magenkarzinomzelllinie (23132/87) und Endothelzellen (HUVEC) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat (0,25 bis 20 mmol/l) inkubiert. Die Zellen wurden bis zu 72 Stunden

den in ihrem empfohlenen Medium (Abb. 3.2) inkubiert, und jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellvitalität mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Messwerte (abzüglich Hintergrund, Tab. 10.1) repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchsserien mit jeweils 2 Parallelwerten. Die Daten für 5 % und 21 % Sauerstoff befinden sich im Anhang. Die Unterschiede in der Laktatbildung innerhalb einer Ketonkörperkonzentration und zwischen den einzelnen Ketonkörperkonzentrationen sind nicht signifikant.

4.5 Expression der an der Ketolyse beteiligten Enzyme

Zusätzlich zu den Untersuchungen zum Einfluss der Ketonkörper auf die Zellteilung wurden die Zelllinien hinsichtlich der Expression der beiden ketolytischen Schlüsselenzyme 3-Ketosäure-CoA-Transferase und Acetyl-Coa-Acetyltransferase (Tab. 1.2) sowie D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (D-3-HBD)¹¹⁾ untersucht. Für die in dieser Arbeit getesteten 6 humanen Tumorzelllinien (5 Kolonkarzinomzelllinien und 1 Magenkarzinomzelllinie) wurde die Präsenz spezifischer mRNA für D-3-HBD und für die beiden ketolytischen Enzyme 3-Ketosäure-CoA-Transferase und Acetyl-CoA-Acetyltransferase erfolgreich mit RT-qPCR nachgewiesen (Abb. 4.12). Der Anteil dieser mRNA-Moleküle in Tumorzellen war im Vergleich zu mRNA, die aus Normalgewebe (Kolon bzw. Magen)¹²⁾ isoliert wurde, zum Teil stark erhöht (> Faktor 2).

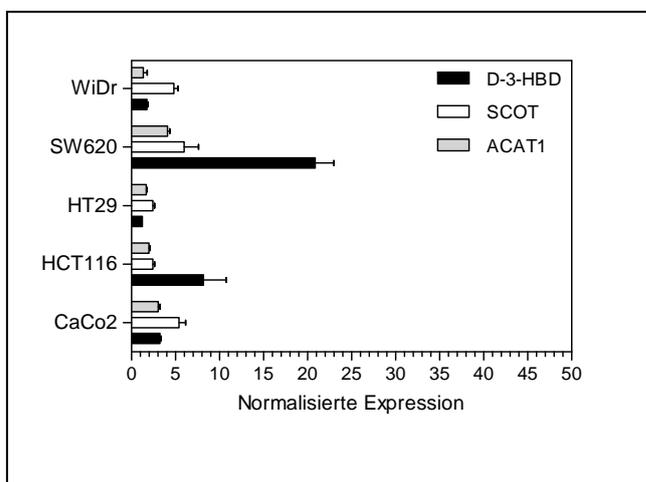


Abb. 4.12. Nachweis der Expression der an der Ketolyse beteiligten Enzyme und von D-3-HBD. Die Expression von D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (D-3-HBD) und der beiden ketolytischen Enzyme 3-Ketosäure-CoA-Transferase (SCOT) und Acetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT1) auf mRNA-Ebene ist im Verhältnis zu ihrer Expression zu Kolon-Normalgewebe gezeigt. Die verwendeten Abkürzungen leiten sich von den englischen Bezeichnungen der Enzyme ab (s. hierzu auch Tab. 1.2). Dieses Ergebnis ist Bestandteil einer Publikation (Otto C et al., 2014).

¹¹⁾ D-3-HBD katalysiert die Umwandlung von D-3-Hydroxybutyrat in Acetacetat und umgekehrt; s. hierzu auch Tab. 1.1.

¹²⁾ Vom Ambion, Life Technologies (www.lifetechnologies.com).

5 Beantwortung der Fragen

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von Ketonkörper (D-3-Hydroxybutyrat) auf Stoffwechsel und Proliferation humaner Karzinomzelllinien in Abhängigkeit von der Versorgung mit Sauerstoff zu untersuchen. Mit den Ergebnissen der Arbeit können die Fragen wie folgt beantwortet werden:

1) Ketonkörper stellen energiereiche Verbindungen dar, die bei ausreichender Versorgung mit Sauerstoff in den Mitochondrien oxidativ verstoffwechselt werden (Vaupel P et al., 1989). Beeinflussen unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) die Verstoffwechslung von Ketonkörper?

Die Daten der Arbeiten deuten darauf hin, dass Zellen humaner Karzinomzelllinien des Gastrointestinaltrakts bei 21 % Sauerstoff Ketonkörper verstoffwechseln. Da es sich hierbei aber um eine unphysiologische Sauerstoffkonzentration handelt, wurden die Untersuchungen ebenfalls bei 5 % Sauerstoff und in Hypoxie (1 % Sauerstoff) durchgeführt. In beiden Fällen wurde keine Verwertung von D-3-Hydroxybutyrat gemessen. Die Daten unterstützen somit das Konzept, dass zur Beurteilung, ob Tumoren Ketonkörper verstoffwechseln oder nicht, zu berücksichtigen ist, ob der Tumor gut oder weniger gut oxygeniert ist.

2) Frühere Arbeiten belegen einen inhibierenden Effekt von Ketonkörper auf die Proliferation von Krebszellen (Magee BA et al., 1979; Skinner R et al., 2009). Hierbei wurden sehr hohe Konzentrationen an Ketonkörper (> 10 mmol/l) eingesetzt. Wie wirken sich physiologisch relevante Konzentrationen an Ketonkörper auf die Proliferation von Zellen gastrointestinaler Karzinomzelllinien aus?

Vier Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat, die unterschiedlichen physiologischen Stoffwechselsituationen entsprechen (Tab. 3.3), wurden untersucht. Weder eine nennenswerte Beeinflussung der Zellzahl wurde beobachtet noch eine Beeinflussung des Glukosestoffwechsels. Glukoseverbrauch und Laktatbildung änderten sich nicht signifikant in Gegenwart von Ketonkörper (s. auch Frage 3).

3) Nach Randle beeinflussen sich die Stoffwechselwege von freien Fettsäuren und Glukose gegenseitig; dies gilt ebenfalls für Ketonkörper und Glukose (Randle PJ et al., 1963). Ist ein möglicher Einfluss von Ketonkörper auf die Glykolyse hinsichtlich Glukoseverbrauch und Laktatbildung nachweisbar?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden umfangreiche Experimente *in vitro* durchgeführt. Hierzu wurden vier Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat (0,25, 4,0, 8,0 und 20 mmol/l) und drei Konzentrationen an Sauerstoff (21 %, 5 % und 1 %) an sieben humanen Zelllinien (Tab. 3.1) ausgetestet. Bei keiner der untersuchten Versuchsbedingungen wurde eine signifikante Beeinflussung des Glukoseverbrauchs bzw. der Laktatbildung gemessen. Mit den durchgeführten Untersuchungen war somit nicht nachzuweisen, dass Ketonkörper die Glykolyse hemmen.

4) Zur Verstoffwechslung von Ketonkörper benötigt die Zelle die beiden an der Ketolyse beteiligten Enzyme 3-Ketosäure-CoA-Transferase und Acetyl-CoA-Acetyltransferase (Tab. 1.2). Ist die Expression dieser beiden Enzyme in den untersuchten humanen Karzinomzelllinien nachzuweisen?

Die Expression der beiden an der Ketolyse beteiligten Enzyme 3-Ketosäure-CoA-Transferase (SCOT) und Acetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT1) und von D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (D-3-HBD)¹³⁾ wurde auf mRNA-Ebene im Verhältnis zu ihrer Expression in Normalgewebe (Kolon bzw. Magen) erfolgreich nachgewiesen¹⁴⁾. Dieses Ergebnis stützt zudem den erfolgreichen Nachweis der Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 21 % Sauerstoff (s. Frage 1).

¹³⁾ D-3-HBD katalysiert die Umwandlung von D-3-Hydroxybutyrat in Acetacetat und umgekehrt; s. hierzu auch Tab. 1.1.

¹⁴⁾ Der Nachweis auf Proteinebene steht noch aus.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Ketonkörper auf die Proliferation von sechs humanen Karzinomzelllinien des Gastrointestinaltraktes *in vitro* untersucht. Da Tumoren in aller Regel mit Sauerstoff unterversorgt sind (Gatenby RA et al., 1988; Vaupel P et al., 1991; Terris DJ, Dunphy EP, 1994), wurden zusätzlich zu den Untersuchungen bei 21 % Sauerstoff ebenfalls überprüft, ob bei 5 % Sauerstoff und bei einer verminderten Sauerstoffversorgung mit 1 % Sauerstoff Ketonkörper die Zellproliferation beeinflussen und von den Zellen verstoffwechselt werden.

6.1 Charakteristika des malignen Stoffwechsels

Zahlreiche Tumoren weisen im Vergleich zu gesunden Geweben eine 20- bis 30-fach erhöhte Glukoseaufnahme auf (Holm E et al., 1995). Diese Eigenschaft von Tumoren wird bei der Positronen-Emissionstomographie (PET) genutzt, um Tumoren zu detektieren und zu monitoren (Ruhmann J et al., 1998; Weber WA et al., 1999; Gambhir SS, 2002; Gatenby RA, Gillies RJ, 2004). Ein entscheidender Vorteil des Glukose-Katabolismus ist, dass Glukose sowohl bei An- als auch Abwesenheit von Sauerstoff verstoffwechselt werden kann. Diese Eigenschaft des Glukose-Katabolismus ist für Tumoren von großer Bedeutung, da eine ausreichende Gewebeoxygenierung keineswegs garantiert ist. Bereits kleinere Tumoren weisen große, mit Sauerstoff und Substraten minderversorgte Areale auf – eine Konsequenz der chaotischen Versorgung von Tumoren mit Blutgefäßen. Bis zu einem Durchmesser von 3 bis 4 mm versorgen sich Tumoren mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusion. Um aber weiter wachsen zu können, sind Tumoren auf die Versorgung über Blutgefäße angewiesen (Folkman J et al., 1971; Hanahan D, Folkman J, 1996). Hierzu sezernieren die Zellen des Tumors zahlreiche Gefäßwachstumsfaktoren, die die Endothelzellen im Tumorstroma zur Bildung neuer Blutgefäße stimulieren (Chen CT, Hung MC, 2013). Die Fähigkeit von Tumoren zur Angiogenese (Abb. 1.1) verhindert aber nicht, dass Tumoren ausgedehnte Areale mit unzureichender Perfusion aufweisen (Kallinowski F et al., 1989). Die kritische Diffusionsstrecke für Sauerstoff

liegt bei ca. 60-80 µm (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004) und setzt damit bei einer interkapillaren Distanz von > 200 µm dem oxidativen Stoffwechsel von Glukose und anderen Energieträgern enge Grenzen (Holm E, 2007). Somit wird aufgrund der mangelnden Oxygenierung der Großteil der Tumormasse die energiereichen Ketonkörper nicht nutzen können. Messungen *in vivo* belegen, dass periphere Gewebe bis zu 3-mal mehr Acetacetat aufnehmen als Tumoren, während Karzinome bis zu 30-mal mehr Glukose aufnehmen als die peripheren Gewebe (Holm E et al., 1995). Dieser Vergleich zur Aufnahme von Glukose und Ketonkörper durch Tumoren zeigt, dass Ketonkörper für Tumoren wohl eine untergeordnete Rolle als Energiequelle spielen. Aus diesen Untersuchungen ist aber nicht zwangsläufig zu folgern, dass Tumoren unfähig sind, Ketonkörper zu verstoffwechseln. Im Gegenteil, Daten der vorliegenden Arbeiten stützen das Konzept, dass Tumoren Ketonkörper verstoffwechseln. Diese Aussage gilt zumindest für die untersuchten humanen Karzinomzelllinien des Gastrointestinaltrakts bei einer – zugegebenermaßen unphysiologischen – Versorgung mit 21 % Sauerstoff. Bereits bei 5 % Sauerstoff scheint eine Verstoffwechslung von Ketonkörpern aber nicht mehr möglich zu sein.

Schnell wachsende Tumoren weisen einen Sauerstoff- und Nährstoffgradienten auf, der sich von der gut versorgten Peripherie zum schlecht durchbluteten Tumorzentrum erstreckt. Tumoren besitzen deshalb häufig große Nekrosen in ihrem Zentrum als Ursache einer unzureichenden Versorgung mit Sauerstoff¹⁵⁾ (Cerniglia GJ et al., 1997; Beppu T et al., 2002; Scigliano S et al., 2008). In dieser Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass unter hypoxischen Bedingungen (1% Sauerstoff) die getesteten Tumorzelllinien nicht in der Lage waren, Ketonkörper zu verstoffwechseln.

6.2 Die Bedeutung von Ketonkörper für den Zellstoffwechsel

Ketonkörper weisen als funktionelle Gruppe eine Keto- bzw. Oxogruppe (>C=O) auf. Zu den physiologisch wichtigen Ketonkörper zählen Acetoacetat und sein

¹⁵⁾ In der Literatur sind hierzu Werte von 2 bis 12 mm Hg zu finden, was 0,3 bis 2 Volumenprozent Sauerstoff entspricht.

Reduktionsprodukt D-3-Hydroxybutyrat (D-3-HB). Chemisch gehört D-3-HB zur Gruppe der Carbonsäuren mit einer zusätzlichen Hydroxygruppe (-OH) als funktionelle Gruppe. Da während der Ketose D-3-HB im Blut auf ein Vielfaches der Konzentration von Acetacetat ansteigt (Cahill GF, 1983), wird D-3-HB zusammen mit Acetacetat und Aceton, dem Decarboxylierungsprodukt ¹⁶⁾ von Acetacetat, zu den Ketonkörper gezählt. Da Acetacetat in aller Regel als D-3-HB im Blut transportiert wird, wurden in der vorliegenden Arbeit vier physiologische Konzentrationen an D-3-HB untersucht: 0,25, 4,0, 8,0 und 20 mmol/l (Tab. 3.3).

Ketonkörper entstehen bei starker Nahrungskarenz oder durch eine ketogene Ernährung (s. auch Einleitung). Die Fähigkeit zur Bildung von Ketonkörper stellt eine lebenswichtige physiologische Anpassung des Körpers an Hungerzeiten dar (Cahill GF, 1970, 1976, 1983). Der Auslöser eines ketogenen Stoffwechsels, unabhängig, ob Nahrungskarenz oder eine ketogene Ernährung die Ursache darstellen, ist der Mangel an Kohlenhydraten mit einem Schwellenwert von weniger als 50 g Kohlenhydraten pro Tag (Westman EC, 2002). Unter diesen Voraussetzungen ¹⁷⁾ werden Ketonkörper in den Mitochondrien von Leberzellen im so genannten Lynen-Zyklus ¹⁸⁾ aus Acetyl-CoA gebildet (McGarry JD, Forster DW, 1980). Während der Ketose produziert die Leber eines gesunden Erwachsenen bis zu 185 g Ketonkörper pro Tag (Laffel L, 1999). Über den Blutkreislauf werden die Ketonkörper zu den extrahepatischen Geweben, hierzu gehören u.a. die Herz- und Skelettmuskulatur und vor allem das Nervensystem, transportiert, wo ihre Aufnahme in die Zelle und ihr Transport in die Mitochondrien über membranständige Transporter aus der Familie der Monocarboxylate, abgekürzt MCT, erfolgt (Halestrap AP, Price NT, 1999). In den Mitochondrien werden die Ketonkörper wieder zu Acetyl-CoA umgewandelt, was als Ketolyse bezeichnet wird (s. Einleitung). Hierzu ist nicht nur Sauerstoff notwendig, sondern die Zelle benötigt auch die zur Ketolyse notwendigen Enzyme (Tab. 1.2).

¹⁶⁾ Acetacetat unterliegt als β -Ketosäure einer langsamen, spontanen Decarboxylierung zu Aceton. Den Acetongeruch kann im Atem von Personen mit einem hohen Acetacetatspiegel im Blut wahrnehmen.

¹⁷⁾ Stoffwechselphysiologisch führt eine geringe Glukoseaufnahme zu einer verminderten Glukoseoxidation und Lipogenese, weil auch der Insulinspiegel abfällt. □

¹⁸⁾ S. auch Tab. 1.1.

Werden beide Voraussetzungen erfüllt, wird D-3-HB zunächst zu je zwei Molekülen Acetyl-CoA abgebaut, die dann in den Citratzyklus einfließen, wo sie die Bildung von Reduktionsäquivalenten (NADH+H⁺) induzieren. Diese werden wiederum zur Bildung von ATP bei der oxidativen Phosphorylierung verwendet. Anders als Fettsäuren entkoppeln Ketonkörper nicht den mitochondrialen Protonengradienten (Veech RL, 2004).

Der bei onkologischen Patienten häufig zu beobachtende dauerhafte Gewichtsverlust ist für ca. 30 % der durch Krebs verursachten Todesfälle verantwortlich (Tisdale M et al., 1987; Tisdale M, 2009; Fearon K et al., 2011). Die Ätiologie dieser als Tumorkachexie bezeichneten inflammatorischen Stoffwechselsituation ist äußerst komplex und im Detail noch nicht vollständig verstanden. Der Stoffwechsel bei Tumorkachexie unterscheidet sich deutlich vom Stoffwechsel durch Nahrungskarenz. Der Hungerstoffwechsel ist gekennzeichnet durch eine verstärkte Fettsäureoxidation mit Bildung von Ketonkörper, während die Tumorkachexie einen hypermetabolen Stoffwechsel mit gesteigerter Glykolyse, Glukoneogenese, Lipolyse und Proteolyse darstellt (Conyers RAJ et al., 1979). Die Tumorkachexie führt zu einem kontinuierlichen Verlust an Muskel- und Fettmasse, während beim Hungerstoffwechsel der Verlust an Muskelmasse zwar nicht gestoppt, aber doch langfristig verringert wird (Cahill GF, 1983). Die Tumorkachexie führt im Gegensatz zum Hungerstoffwechsel in aller Regel auch zu keiner Ketose (Conyers RAJ et al., 1979).

Die metabolischen Besonderheiten der Tumorkachexie und die Abhängigkeit der Tumoren von Glukose lassen das supportive Konzept einer fettreichen bzw. ketogenen Diät beim von Mangelernährung bedrohten onkologischen Patienten sinnvoll erscheinen (Blaue Ratgeber der Deutschen Krebshilfe). Die Argumente hierzu werden an anderer Stelle eingehend diskutiert (Holm E, Kämmerer U, 2011). Eine ketogene Diät kann dabei aber nur unterstützend wirken und niemals eine leitliniengerechte Krebstherapie ersetzen. In der Gesamtschau hat eine ketogene Ernährung aber zahlreiche Vorteile für den onkologischen Patienten. So wird die Muskel- und Fettmasse stabilisiert und der Gewichtsverlust

gestoppt (Holm E, 2007). Daten der Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg belegen, dass eine ketogene Ernährung die Lebensqualität von Krebspatienten fördert (Schmidt M et al., 2011). In diesem Zusammenhang ist eine aktuelle Publikation in Science Translational Medicine zu erwähnen, die zeigt, dass kurze Hungerperioden (Glukoserestriktion) Tumorzellen empfindlicher auf Chemotherapeutika reagieren lassen (Lee C et al., 2012; Safdie F et al., 2012). Dieses Beispiel verdeutlicht, dass intelligente Konzepte in der Onkologie, in die auch die Ernährung eingebunden wird, zu einer Optimierung aktueller onkologischer Behandlungsstrategie führen können.

6.3 Metabolisierung von Ketonkörper durch maligne Zellen

Im Gegensatz zur Wirksamkeit einer ketogenen Ernährung bei insbesondere zerebralen Erkrankungen wird der supportive Nutzen von Ketonkörper für den onkologischen Patienten kontrovers diskutiert (s. Einleitung). So ist z.B. nicht zweifelfrei geklärt, ob ein erhöhter Ketonkörperspiegel das Wachstum von Tumorzellen stimuliert oder hemmt (Magee BA et al., 1979; Seyfried TN et al., 2003; Bonuccelli G et al., 2010). Andererseits liegen vereinzelt Fallberichte vor, die den wachstumsverzögernden Effekt einer ketogenen Ernährung bei Hirntumoren belegen (Nebeling LC et al., 1995; Zuccoli G et al., 2010); zudem laufen aktuell zahlreiche Studien zur Wirksamkeit dieser Ernährung bei Krebspatienten (www.clinicaltrials.gov).

Für die In-vivo-Situation wird die Fähigkeit von Tumorzellen zur Ketolyse selten im Zusammenhang mit dem Versorgungsstatus des Tumors gesehen. Kleine Tumoren weisen eine gute Sauerstoffversorgung auf und können ihren Energiebedarf sicherlich auch durch die Oxidation von Ketonkörper decken. Mit zunehmender Tumorgöße verringert sich die Sauerstoffversorgung und eine Metabolisierung von Ketonkörper erscheint dann unwahrscheinlich. So belegen Differenzmessungen zur Aufnahme von Ketonkörper durch das Malignom¹⁹⁾, dass die Nettoaufnahme für Ketonkörper äußerst gering und damit für den Stoffwechsel weitestgehend bedeutungslos ist (Holm E, 2007). Im Gegensatz

¹⁹⁾ □ Hierzu wird die Konzentration an Ketonkörper im Blut vor und nach Tumorpassage ermittelt.

dazu stehen Ergebnisse entsprechender Versuche im Tierexperiment. So berichten Sauer und Kollegen, dass bereits 52 % des Acetacetats und 30 % des D-3-Hydroxybutyrats nach nur einer Passage durch den Tumor resorbiert werden (Sauer LA et al., 1983, 1987). Daten, die eine ähnliche Interpretation zulassen, wurden auch für das Plattenepithelkarzinom und das Mammakarzinom veröffentlicht (Kallinowski F et al., 1988). Die Ursachen für die offensichtlichen Unterschiede bei der Differenzmessung an soliden Tumoren im Tiermodell und in der humanen Situation sind nicht bekannt. Eine Erklärung hierfür wird sicherlich im Zusammenhang mit der Sauerstoffversorgung zu sehen sein. So wäre es möglich, dass die im Tiermodell untersuchten Tumoren eine im Vergleich zur humanen Situation zu gute Oxygenierung aufweisen.

Vor kurzem wurden weitere Daten präsentiert, die auf ein durch D-3-Hydroxybutyrat verstärktes Tumorwachstum in einem Xenograft-Mausmodell hindeuten. Das experimentelle Design hierzu basierte auf der täglichen intraperitonealen Applikation von 500 mg/kg D-3-Hydroxybutyrat²⁰⁾ pro Maus, wodurch das Wachstum der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 derart beschleunigt wurde, dass nach drei Wochen die Tumoren ein 2,5-fach größeres Volumen aufwiesen als die der unbehandelten Kontrolltiere (Bonuccelli G et al., 2010). Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht geklärt, ob die Aussage dieser Arbeit zu verallgemeinern ist, dass Ketonkörper einen wachstumsfördernden Effekt auf Tumoren ausübt. Unverständlich erscheint, dass in der Arbeit keinerlei Angaben zu den Ketonkörperspiegel gemacht wurden²¹⁾. Im Gegensatz zu dieser Arbeit stehen Daten zahlreicher In-vivo-Experimente zur Verfügung, die eine verzögernde Wirkung von Ketonkörper auf das Tumorwachstum belegen. Auch Daten der eigenen Arbeitsgruppe zu einer durch ketogene Ernährung induzierten Hyperketonämie zeigen einen verzögernden Effekt auf das Wachstum humaner Magenkarzinomzellen in immuninkompetenten Mäusen (Otto C et al., 2008).

²⁰⁾ Die Dosis bewegt in einer Größenordnung, die bei täglicher oraler Einnahme von D-3-Hydroxybutyrat zu therapeutisch relevanten Ketonkörperspiegel zwischen 0,19 und 0,36 mmol/l führt (Veech RL, 2004).

²¹⁾ Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an Mäusen zeigen, dass eine Dosis von 500 mg/kg D-3-Hydroxybutyrat innerhalb von 20 Minuten nach intraperitonealer Applikation zu einem Blutketonkörperspiegel von 1,3 mmol/l führt und dass innerhalb von 5 Stunden der Ausgangswert von 0,2 mmol/l wieder erreicht wird. Im Gegensatz dazu wird mit einer ketogenen Ernährung bei den Tieren dauerhaft ein Ketonkörperspiegel von über 1 mmol/l erreicht (Otto C et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde weder ein stimulierender, noch ein inhibierender Effekt von D-3-Hydroxybutyrat auf das Zellwachstum humaner Karzinomzelllinien des Gastrointestinaltrakts beobachtet. Damit lassen sich bereits veröffentlichte Daten zu In-vitro-Experimenten nicht bestätigen, die auf einen inhibitorischen Effekt von Ketonkörper hinweisen (Magee BA et al., 1979). Den inhibitorischen Effekt der Ketonkörper erklärten die Autoren dieser Arbeit damit, dass die Ketonkörper vermehrt in Form von Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust werden. Dadurch steigen die Metabolite im Citratzyklus an und in der Folge kommt es zum Übertritt von Citrat ins Cytosol, wo es die Phosphofruktokinase, das Schrittmacherenzym der Glykolyse, allosterisch hemmt (Newsholme EA, 1976). Die gegenseitige Beeinflussung der Stoffwechselwege für Glukose und Fettsäuren bzw. Ketonkörper wurde bereits in den frühen 60er Jahren des letzten Jahrhunderts durch Randle postuliert (Randle PJ et al., 1963).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Zellen humaner gastrointestinaler Karzinomzelllinien bei ausreichender Versorgung mit Sauerstoff Ketonkörper metabolisieren, nicht aber bei 5 % Sauerstoff und nicht unter hypoxischen Bedingungen bei 1 % Sauerstoff. Eine ketogene Stoffwechsellage verhindert bzw. fördert nicht per se das Wachstum von Tumorzellen *in vitro*. Auch wurde keine Beeinflussung des Glukosemetabolismus durch Ketonkörper beobachtet. Weder der Glukoseverbrauch, noch die Laktatbildung änderten sich signifikant in Gegenwart von Ketonkörper.

Die Bedeutung von Ketonkörper für den Tumorstoffwechsel lässt sich durch diese Arbeit nicht abschließend bewerten. Weitere Untersuchungen bei physiologischen Sauerstoffkonzentrationen sind auf jeden Fall notwendig, um zu verstehen, welchen Anteil Ketonkörper tatsächlich an der Energieversorgung von Krebszellen haben und ob die physiologische Versorgung solider Tumoren mit Sauerstoff eine Verstoffwechslung von Ketonkörper überhaupt ermöglicht.

7 Ausblick

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass Ketonkörper zwar die Zellteilung humaner gastrointestinaler Karzinomzellen nicht beeinflussen, dass diese aber in der Lage sind, Ketonkörper bei ausreichender Versorgung mit Sauerstoff zu verstoffwechseln.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten liefern einen wichtigen Hinweis für die Bedeutung von Sauerstoff für die Verwertung von Ketonkörper. In Tumorgeweben sind Sauerstoffkonzentrationen von weniger als 2 % eher die Regel als die Ausnahme. Nach den Daten dieser Arbeit werden bei Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % keine Ketonkörper verstoffwechselt. Die Daten hierzu basieren auf Messungen der Ketonkörperspiegel im Kulturüberstand der Zellen. Absolute Gewissheit für eine Verstoffwechslung ist jedoch nur aus Versuchen mit radioaktiven Ketonkörper zu erhalten. Wird durch Massenspektroskopie nachgewiesen, dass die in Ketonkörper befindliche ^{14}C -Markierung im Citrat nachzuweisen ist, so ist das ein eindeutiger Beweis dafür, dass das aus Ketonkörper gebildete Acetyl-CoA (Tab. 1.2) mit Oxalacetat kondensiert (katalysiert durch die Citrat-Synthetase). Aufgrund der vorliegenden Daten sind radioaktive Markierungsversuche auf jeden Fall notwendig.

8 Zusammenfassung

Karzinomzellen können bei ausreichender Versorgung mit Sauerstoff neben Glukose zahlreiche weitere Energieträger wie Ketonkörper oxidativ verstoffwechseln. In Hypoxie (< 1% Sauerstoff) dagegen steht den Karzinomzellen ausschließlich Glukose als Energieträger zur Verfügung, da Glukose auch ohne Sauerstoff verstoffwechselt werden kann. Ketonkörper stellen energiereiche Verbindungen dar, die im Rahmen eines gesteigerten Fettsäureabbaus in der Leber im Lypen-Zyklus entstehen.

Im Gegensatz zur Wirksamkeit einer ketogenen Ernährung bei insbesondere zerebralen Erkrankungen wird der supportive Nutzen von Ketonkörper für den onkologischen Patienten kontrovers diskutiert. Die entscheidende Frage, ob und unter welchen Bedingungen Tumoren Ketonkörper zur Energiegewinnung nutzen können, ist nicht abschließend geklärt. Während bei Störungen des Glukosestoffwechsels Ketonkörper als alternative Energiequelle therapeutisch relevant sind, sollen Krebszellen diesen Energieträger nicht für ihr Wachstum nutzen. Für diese Annahme spricht, dass Tumoren trotz ihrer Fähigkeit zur Angiogenese mit Sauerstoff unterversorgt sind und dass der auf hypoxische Bedingungen angepasste Tumorstoffwechsel eindeutig Glukose als Energieträger bevorzugt. Diese Anpassung führt zu einer Hochregulierung glykolytischer Enzyme, die sowohl durch den Hypoxie-induzierten Faktor-1 α (HIF-1 α) als auch durch Protoonkogene bzw. Tumorsuppressorgene wie KRAS, MYC oder p53, vermittelt wird. Ein auf Glukose basierender Stoffwechsel produziert sehr viel schneller ATP als dies mit der oxidativen Phosphorylierung möglich ist; außerdem stellt die Glykolyse kontinuierlich Zwischenprodukte für biosynthetische Stoffwechselwege zur Verfügung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, an den sechs gastrointestinalen Karzinomzelllinien CaCo, HCT116, HT29, SW620, WiDr und 23132/87 zu untersuchen, ob Ketonkörper den Anteil vitaler Zellen durch Hemmung der Zellteilung verringern. Hierzu wurden umfangreiche In-vitro-Experimente mit unterschiedlichen Kon-

zentrationen an Sauerstoff (21, 5 und 1 %) und D-3-Hydroxybutyrat (0,25, 4,0, 8,0 und 20 mmol/l) durchgeführt. Zusätzlich wurde überprüft, ob Ketonkörper die Glykolyse beeinflussen. Hierzu wurden der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion bestimmt.

Die sechs humanen gastrointestinalen Karzinomzelllinien exprimieren die zur Ketolyse notwendigen Enzyme. Die Zellen oxidieren D-3-Hydroxybutyrat zwar eindeutig bei 21 % Sauerstoff, nicht aber bei physiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % Sauerstoff. Ein Effekt von Ketonkörper, der bereits vor mehr als 30 Jahren beschrieben wurde, nämlich die Hemmung der Zellteilung, wurde in der vorliegenden Arbeit für keine der vier Konzentrationen an D-3-Hydroxybutyrat bei keiner der drei Konzentrationen an Sauerstoff an den untersuchten Zellen beobachtet. Eine Ausnahme war lediglich bei 20 mmol/l D-3-Hydroxybutyrat nach 72 Stunden in Kultur bei einer Sauerstoffkonzentration von 21 % festzustellen gewesen. Unter diesen Bedingungen nahm die Anzahl vitaler Zellen um bis zu 35 % im Vergleich zur Kontrolle (keine Ketonkörper) bei CaCo2, HT29, SW620 und 23132/87 ab. Auch war keine Beeinflussung der Glykolyse durch Ketonkörper nachzuweisen. Weder der Glukoseverbrauch noch die Laktatbildung wiesen signifikante Differenzen bei Inkubation der Zellen mit D-3-Hydroxybutyrat auf.

Die Daten der Arbeit zeigen, dass Zelllinien gastrointestinaler Tumoren über die Fähigkeit verfügen, D-3-Hydroxybutyrat bei ausreichender Oxygenierung zu verstoffwechseln. Bei einer Sauerstoffversorgung, die auch *in vivo* in Tumoren zu messen ist, wurde dagegen kein Verbrauch von D-3-Hydroxybutyrat nachgewiesen. Auch beeinflussten Ketonkörper die Zunahme vitaler Zellen nur geringfügig. Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist somit, dass Zellen humaner Karzinomzelllinien des Gastrointestinaltrakts über die Fähigkeit verfügen, Ketonkörper zu verstoffwechseln. Zudem führen ausschließlich Messungen bei Sauerstoffkonzentrationen, die für die In-vivo-Situation relevant sind, zu aussagekräftigen Ergebnissen.

9 Literaturverzeichnis

- Beppu T**, Kamada K, Yoshida Y, Arai H, Ogasawara K, Ogawa A. Change of oxygen pressure in glioblastoma tissue under various conditions. *J Neurooncol* 2002; 58(1): 47-52.
- Bertout JA**, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8 (12): 967-975.
- Bonuccelli G**, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, Flomenberg N, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle* 2010; 9(17): 3506-3514.
- Bougneres PF**, Lemmel C, Ferré P, Bier DM. Ketone body transport in the human neonate and infant. *J Clin Invest* 1986; 77(1): 42-48.
- Bustin SA**, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 2009; 4 (55): 611-622.
- Cahill GF Jr.** Starvation in man. *N Engl J Med* 1970; 282(12): 668-675.
- Cahill GF Jr.** Starvation in man. *Clin Endocrinol Metab* 1976; 5 (2): 397-415.
- Cahill GF Jr.** Starvation. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1983; 94: 1-21.
- Cerniglia GJ**, Wilson DF, Pawlowski M, Vinogradov S, Biaglow J. Intravascular oxygen distribution in subcutaneous 9L tumors and radiation sensitivity. *J Appl Physiol* 1997; 82(6): 1939-1945.
- Chen CT**, Hung MC. Beyond anti-VEGF: dual-targeting antiangiogenic and antiproliferative therapy. *Am J Transl Res* 2013; 5(4): 393-403.
- Chomczynski P**, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-159.
- Conyers RA**, Need AG, Rofe AM, Potezny N, Kimber RJ. Nutrition and cancer. *Br Med J* 1979; 1(6171): 1146.
- Fearon ER**, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61 (5): 759-767.
- Fearon K**, Strasser F, Anker SD, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* 2011; 12: 489-495.

- Fine EJ**, Miller A, Quadros EV, Sequeira JM, Feinman RD. Acetoacetate reduces growth and ATP concentration in cancer cell lines which over-express uncoupling protein 2. *Cancer Cell Int* 2009; 9: 14
- Flick DA**, Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 1984; 68 (1-2): 167-175.
- Folkman J**, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971; 133(2): 275-288.
- Freeman JM**, Kossoff EH, Hartman AL. The ketogenic diet: one decade later. *Pediatrics* 2007; 119(3): 535-543.
- Gambhir SS**. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* 2002; 2 (9): 683-693
- Gatenby RA**, Kessler HB, Rosenblum JS, Coia LR, Moldofsky PJ, Hartz WH, Broder GJ. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 14(5): 831-838
- Gatenby RA**, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; 4 (11): 891-899.
- Gatenby RA**, Smallbone K, Maini PK, Rose F, Averill J, Nagle RB, Worrall L, Gillies RJ. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer* 2007; 97 (5): 646-653.
- Halestrap AP**, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 1999; 343: 281-299.
- Hanahan D**, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3): 353-364.
- Hanahan D**, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100 (1): 57-70.
- Hanahan D**, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144 (5): 646-674.
- Holm E**, Hagemüller E, Staedt U, Schlickeiser G, Günther HJ, Leweling H, Tokus M, Kollmar HB. Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Res* 1995; 55(6): 1373-1278.
- Holm E**. Stoffwechsel und Ernährung bei Tumorkrankheiten. Georg Thieme Verlag KG 2007, 1. Auflage (ISBN 978-3131422019).
- Holm E** und Kämmerer U. Fette und Kohlenhydrate in Ernährungskonzepten für Tumorpatienten. *Aktuel Ernährungsmed* 2011; 36(5): 286-298.

- Javier RT**, Butel JS. The history of tumor virology. *Cancer Res* 2008; 68 (19): 7693-7706.
- Kallinowski F**, Vaupel P, Runkel S, Berg G, Fortmeyer HP, Baessler KH, Wagner K, Mueller-Klieser W, Walenta S. Glucose uptake, lactate release, ketone body turnover, metabolic microenvironment, and pH distributions in human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res* 1988; 48(24 Pt1): 7264-7272.
- Kallinowski F**, Schlenger KH, Runkel S, Kloes M, Stohrer M, Okunieff P, Vaupel P. Blood flow, metabolism, cellular microenvironment, and growth rate of human tumor xenografts. *Cancer Res* 1989; 49(14): 3759-3764.
- Kämmerer U**, Otto C. Ketogene Diät bei Krebs. *CHAZ* 2014; 15(1): 51-56.
- Kaplan LA**, Pesce AJ (eds). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation*. The C.V. Mosby Company 1989, 2. Auflage, St. Louis.
- Kim JW**, Gao P, Dang CV. Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26 (2): 291-298.
- Krebs HA**. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem* 1972; 8: 1-34.
- Kroemer G**, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008; 13(6): 472-482.
- Laffel L**. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 1999; 15(6): 412-426.
- Lee C**, Raffaghello L, Brandhorst S, Safdie FM, Bianchi G, Martin-Montalvo A, Pistoia V, Wei M, Hwang S, Merlino A, Emionite L, de Cabo R, Longo VD. Fasting Cycles Retard Growth of Tumors and Sensitize a Range of Cancer Cell Types to Chemotherapy. *Sci Transl Med* 2012; 4(124):124ra27.
- Loeb LA**, Harris CC. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Res* 2008; 68 (17): 6863-6872.
- Lynen F**, Ocoa S. Enzymes of fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1953(12): 299-314.
- McGarry JD**, Forster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Ann Rev Biochem* 1980; 49: 395-420.
- Magee BA**, Potezny N, Rofe AM, Conyers RA. The inhibition of malignant cell growth by ketone bodies. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1979; 57(5): 529-539.
- McNally MA**, Hartman AL. Ketone bodies in epilepsy. *J Neurochem* 2012; 121(1): 28-35.

- Moreno-Sánchez R**, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007; 274 (6): 1393-1418.
- Moreno-Sánchez R**, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC. The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *Biofactors* 2009; 35(2): 209-225.
- Mitchell P**. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 1961; 191: 144-148
- Newsholme EA**. Carbohydrate metabolism in vivo: regulation of the blood glucose level. *Clin Endocrinol Metab* 1976; 5(3): 543-578.
- Nebeling LC**, Miraldi F, Shurin SB, Lerner E. Effects of a ketogenic diet on tumor metabolism and nutritional status in pediatric oncology patients: two case reports. *J Am Coll Nutr* 1995; 14(2): 202-208.
- Owen OE**, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF Jr. Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest* 1967; 46(10): 1589-1595.
- Otto C**, Kaemmerer U, Illert B, Muehling B, Pfetzer N, Wittig R, Voelker HU, Thiede A, Coy JF. Growth of human gastric cancer cells in nude mice is delayed by a ketogenic diet supplemented with omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides. *BMC Cancer* 2008; 8: 122.
- Otto C**, Kämmerer U. Die ketogene Diät als Ernährungsoption für Tumorpatienten. In: Krankheitsbedingte Mangelernährung (Hrsg. A. Weimann, T. Schütz, H. Lochs) Pabst Science Publishers 2010 (ISBN 978-3-89967-600-6)
- Otto C**, Klingelhöffer C, Biggemann L, Melkus G, Mörchel P, Jürgens C, Gahn S, Kämmerer U. Untersuchungen zur Verstoffwechslung von Ketonkörper und Laktat durch Tumorzellen des Gastrointestinaltrakts. *Aktuel Ernährungsmed* 2014; 39: 51-59.
- Pfaffl MW**. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001; 29: 2000-2007.
- Racker E**. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem* 1974; 5 (1-2): 17-23.
- Randle PJ**, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 1(7285): 785-789.
- Ruhlmann J**, Oehr P, Biersack HJ. PET in der Onkologie: Grundlagen und klinische Anwendung. Springer, 1998; ISBN 3-540-64632-9.
- Salway JG**. Metabolism at a Glance. Third Edition. Blackwell Publishing Ltd. 2004.

- Safdie F**, Brandhorst S, Wei M, Wang W, Lee C, Hwang S, Conti PS, Chen TC, Longo VD. Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy. *PLoS One* 2012; 7(9): e44603.
- Sauer LA**, Dauchy RT. Ketone body, glucose, lactic acid, and amino acid utilization by tumors in vivo in fasted rats. *Cancer Res* 1983; 43(8): 3497-3503.
- Sauer LA**, Dauchy RT. Blood nutrient concentrations and tumor growth in vivo in rats: relationships during the onset of an acute fast. *Cancer Res* 1987; 47(4): 1065-1068.
- Shaw RJ**. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18(6): 598-608.
- Sawai M**, Yashiro M, Nishiguchi Y, Ohira M, Hirakawa K. Growth-inhibitory effects of the ketone body, monoacetoacetin, on human gastric cancer cells with succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase (SCOT) deficiency. *Anticancer Res* 2004; 24(4): 2213-2217.
- Schmidt M**, Pfetzer N, Schwab M, Strauss I, Kämmerer U. Effects of a ketogenic diet on the quality of life in 16 patients with advanced cancer: A pilot trial. *Nutr Metab (Lond)* 2011; 8(1): 54.
- Scigliano S**, Pinel S, Poussier S, Fouyssac F, Plenat F, Karcher G, Chastagner P. Measurement of hypoxia using invasive oxygen-sensitive electrode, pimonidazole binding and 18F-FDG uptake in anaemic or erythropoietin-treated mice bearing human glioma xenografts. *Int J Oncol* 2008; 32(1): 69-77.
- Seyfried TN**, Sanderson TM, El-Abbadi MM, McGowan R, Mukherjee P. Role of glucose and ketone bodies in the metabolic control of experimental brain cancer. *Br J Cancer* 2003; 89(7): 1375-1382.
- Skinner R**, Trujillo A, Ma X, Beierle EA. Ketone bodies inhibit the viability of human neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg* 2009; 44(1): 212-216.
- Solaini G**, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1797(6-7): 1171-1177.
- Stafstrom CE**, Rho JM. The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. *Front Pharmacol* 2012; 3: 59.
- Terris DJ**, Dunphy EP. Oxygen tension measurements of head and neck cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120(3): 283-287.
- Tisdale MJ**, Brennan RA. Loss of acetoacetate coenzyme A transferase activity in tumours of peripheral tissues. *Br J Cancer* 1983; 47(2): 293-297.
- Tisdale MJ**, Brennan RA, Fearon KC. Reduction of weight loss and tumour size in a cachexia model by a high fat diet. *Br J Cancer* 1987; 56(1): 39-43.

- Tisdale MJ.** Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev* 2009; 89(2): 381-410.
- Vandesompele J,** De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2000; 3(7): RESEARCH0034.
- Vanitallie TB,** Nufert TH. Ketones: metabolism's ugly duckling. *Nutr Rev* 2003; 61 (10): 327-341.
- Vaupel P,** Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989; 49 (23): 6449-6465.
- Vaupel P,** Schlenger K, Knoop C, Höckel M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 1991; 51(12): 3316-3322.
- Vaupel P,** Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26 (2): 225-239.
- Vaupel P,** Höckel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(8): 1221-1235.
- Vaupel P,** Kelleher DK. Blood flow and oxygenation status of prostate cancers. *Adv Exp Med Biol* 2013; 765: 299-305.
- Veech RL.** The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 70 (3): 309-319
- Vollmers HP,** Stulle K, Dämmrich J, Pfaff M, Papadopoulos T, Betz C, Saal K, Müller-Hermelink HK: Characterization of four new gastric cancer cell lines. *Virchows Arch* 1993; 63: 335-343.
- Wallace DC.** Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(10): 685-698
- Warburg O,** Minami S. Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. *Klinische Wochenschrift* 1923; 2 (17): 776-777
- Warburg O,** Posener K, Negelein E. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem Z* 1924; 152: 309-344.
- Warburg O,** Christian W, Griese A. Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und seine Wirkungsweise. *Biochem Z* 1935; 282, 157-205.
- Weber WA,** Avril N, Schwaiger M. Relevance of positron emission tomography (PET) in oncology. *Strahlenther Onkol* 1999; 175 (8): 356-373.

Westman EC. Is dietary carbohydrate essential for human nutrition? *Am J Clin Nutr* 2002; 75(5): 951-953.

Wilder R, 1921: High fat diets in epilepsy. *Mayo Clin Bull* 2: 307-308.

Zuccoli G, Marcello N, Pisanello A, Servadei F, Vaccaro S, Mukherjee P, Seyfried TN. Metabolic management of glioblastoma multiforme using standard therapy together with a restricted ketogenic diet: Case Report. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7: 33.

10 Appendix

Tab. 10.1: Überprüfung der Genauigkeit zur Bestimmung von Glukose und Laktat in den verschiedenen Kulturmedien (Tab. 3.2) mit dem Cobas 8000 Modular Analyse System (Roche Diagnostics, Mannheim). Der erste Wert für Glukose und Laktat gibt den Sollwert an, der zweite Wert den Messwert. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Messreihen.

Medium	D-Glukose [mmol/l]		Laktat [mmol/l]	
RPMI 1640	11	10,3 ± 0,03	0	1,6 ± 0,0
Mc Coy	17	15,6 ± 0,06	0	1,6 ± 0,0
Leibovitz L-15	5,0	0,31 ± 0,03 ¹⁾	0	1,6 ± 0,0
DMEM <i>high glucose</i>	25	22,9 ± 0,08	0	1,6 ± 0,0
<i>ECGM</i> ²⁾		5,6 ± 0,03	0	0,0 ± 0,0

¹⁾ enthält D-Galaktose (5 mmol/L) als Kohlenstoffquelle. Eine eingestellte Laktatkonzentration von 5 mmol/l führte zu Messwerten um 6,8 ± 0,08 mmol/l. ²⁾ *Endothelial Cell Growth Medium* von Promega.

Tab.10.2: Bestimmung von Ketonkörper in verschiedenen Kulturmedien. Ketonkörper wurden mit dem „Freestyle Precision β-Ketone“-Messgerät der Firma Abbott und entsprechenden Biosensoren (Sensormessstreifen) bestimmt (Kapitel 3.8). In der Spalte „Medium“ ist der jeweilige Sollwert an D-3-Hydroxybutyrat angegeben und die gemessenen Werte in der Spalte zum jeweiligen Medien. Der vom Hersteller angegebene Messbereich reicht von 0,0 mmol/l bis 8,0 mmol/l bei einer Schwankung von max. 3,8 % bei Messungen mit Vollblut. Gezeigt sind die Messwerte von bis zu drei Wiederholungsmessungen. Bis auf *ECGM* enthielten alle Medien 10 % FCS. Die Temperatur der Medien betrug 37°C. Das Molekulargewicht von Natrium D-3-Hydroxybutyrat beträgt 128,07 g.

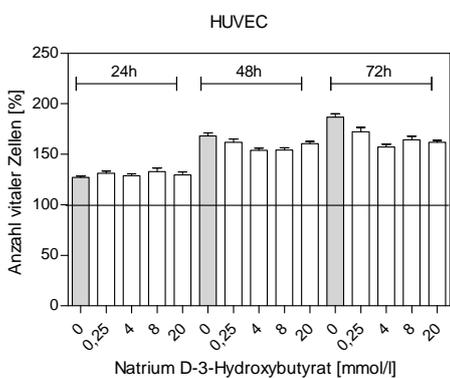
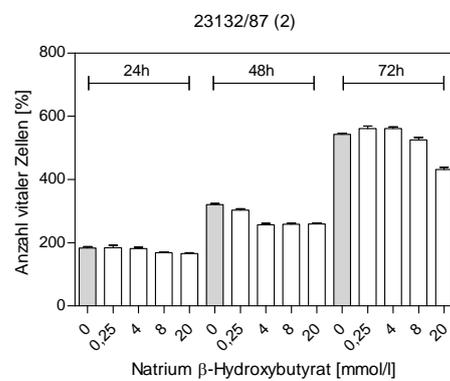
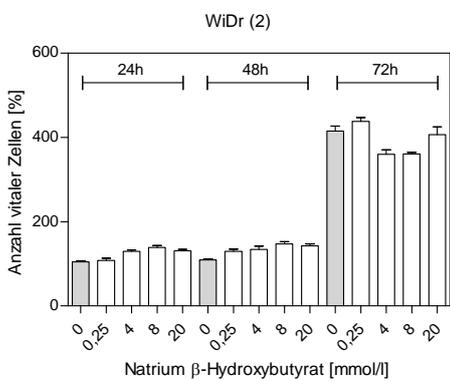
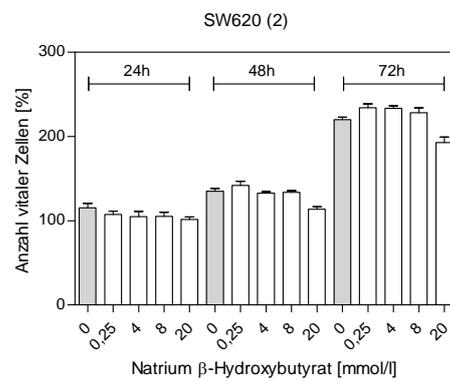
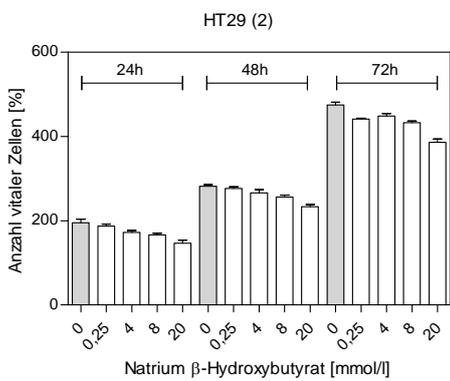
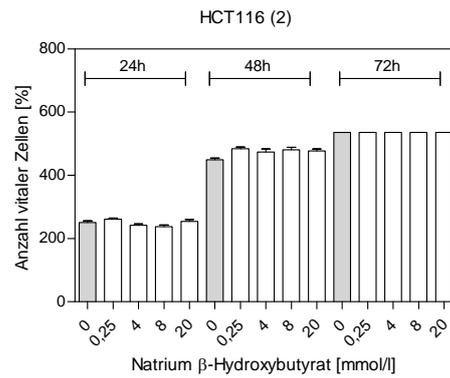
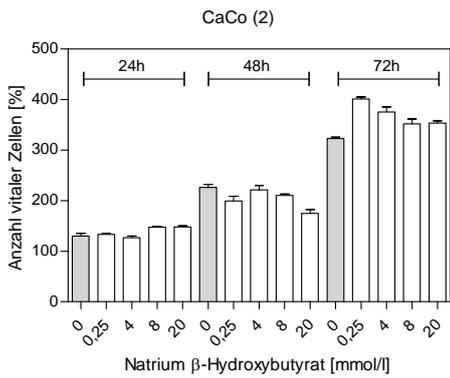
Medium	RPMI 1640	Mc Coy	L-15 ¹⁾	DMEM ²⁾	<i>ECGM</i> ³⁾
0	0,0 (3x)	0,0 (3x)	0,0 (3x)	0,0 (3x)	0,0 (3x)
0,25	0,1 (3x)	0,1-0,1-0,2	0,2 (3x)	0,1(3x)	0,6 (3x)
4,0	3,3-3,4-3,4	3,4 (2x)	2,3-2,4-2,6	3,5-3,6-3,8	3,8-4,0-4,1
8,0	4,6-4,8-5,1	4,6-4,8-4,8	2,7-3,4-3,5	5,9-6,6-6,6	7,2-7,3
20,0	6,6-7,0-7,4	6,8-7,3-7,4	4,3-5,0-5,2	>8,0 (3x)	7,2-7,3

¹⁾ Leibovitz L-15; ²⁾ DMEM high glucose; ³⁾ *Endothelial Cell Growth Medium*.

Tab.10.3: Bestimmung der Zellverdopplungszeit bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen. Die Verdopplungszeiten sind in Stunden angegeben; in Klammern die Zunahme der Verdopplungszeit in Prozent. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung für einen repräsentativen Versuch mit bis zu 6 Parallelwerten. Siehe auch Abb. 4.1.

	Sauerstoffgehalt		
	21 %	5 %	1 %
CaCo2	30,72 \pm 1,58	49,38 \pm 1,48 (60,7 %)	61,84 \pm 2,73 (101,3 %)
HCT116	31,59 \pm 1,23	35,21 \pm 1,21 (11,5 %)	53,71 \pm 5,19 (70,0 %)
HT29	33,57 \pm 2,77	40,72 \pm 4,19 (21,3 %)	60,75 \pm 6,64 (81,0 %)
SW620	43,04 \pm 3,80	77,73 \pm 9,46 (80,6 %)	99,19 \pm 7,40 (130,5 %)
WiDr	49,58 \pm 7,45	53,01 \pm 8,92 (6,9 %)	63,35 \pm 7,55 (27,8 %)
23132/87	25,61 \pm 1,83	69,68 \pm 3,23 (172,1 %)	74,93 \pm 5,05 (193 %)
HUVEC	87,51 \pm 9,78	90,32 \pm 9,56 (3,2 %)	88,67 \pm 12,1 (1,3 %)

Abb. 10.1 (S. 60): Der Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat auf das Zellwachstum bei 21 % Sauerstoff (Versuchsserie 2). Fünf gastrointestinale Zelllinien (CaCo2, HCT116, HT29, SW620 und WiDr), eine Magenkarzinomzelllinie (23132/87) und Endothelzellen (HUVEC) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ketonkörper (0,25 bis 20 mmol/l) kultiviert. Verwendet wurde das Natriumsalz der D-3-Hydroxybuttersäure (D-3-Hydroxybutansäure). Die Zellen wurden bis zu 72 Stunden in ihrem empfohlenen Medium (Abb. 3.2) inkubiert und jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden die Zellvitalität mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung für eine repräsentative Versuchsserie mit jeweils 6 Parallelwerten dargestellt. Siehe auch Abb. 4.3, Versuchsserie 1.



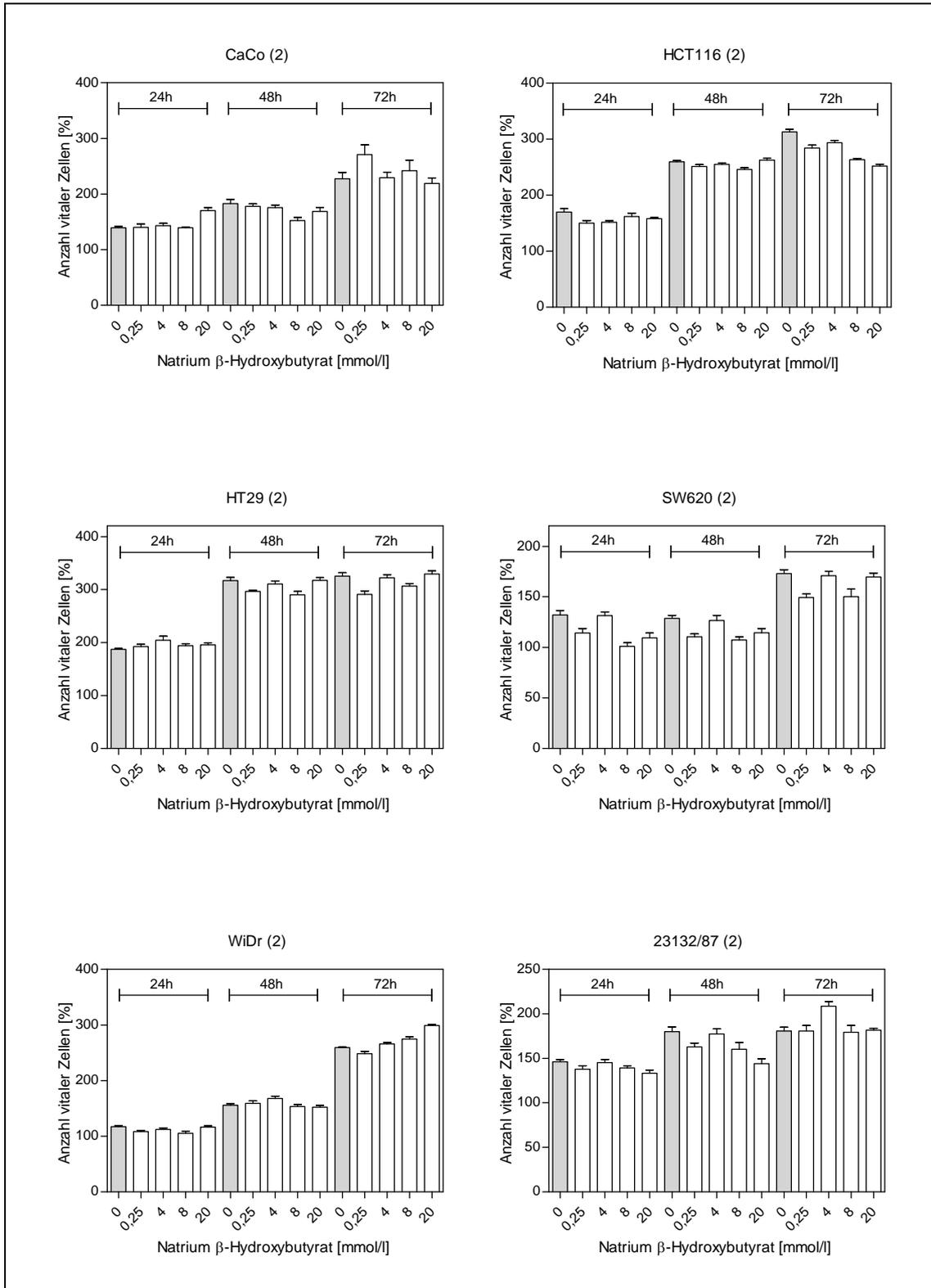


Abb. 10.2: Der Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat auf das Zellwachstum bei 1 % Sauerstoff (Versuchsserie 2). Fünf gastrointestinale Zelllinien (CaCo₂, HCT116, HT29, SW620 und WiDr), eine Magenkarzinomzelllinie (23132/87) und Endothelzellen (HUVEC) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ketonkörper inkubiert. Für weitere Informationen siehe Abb. 4.5.

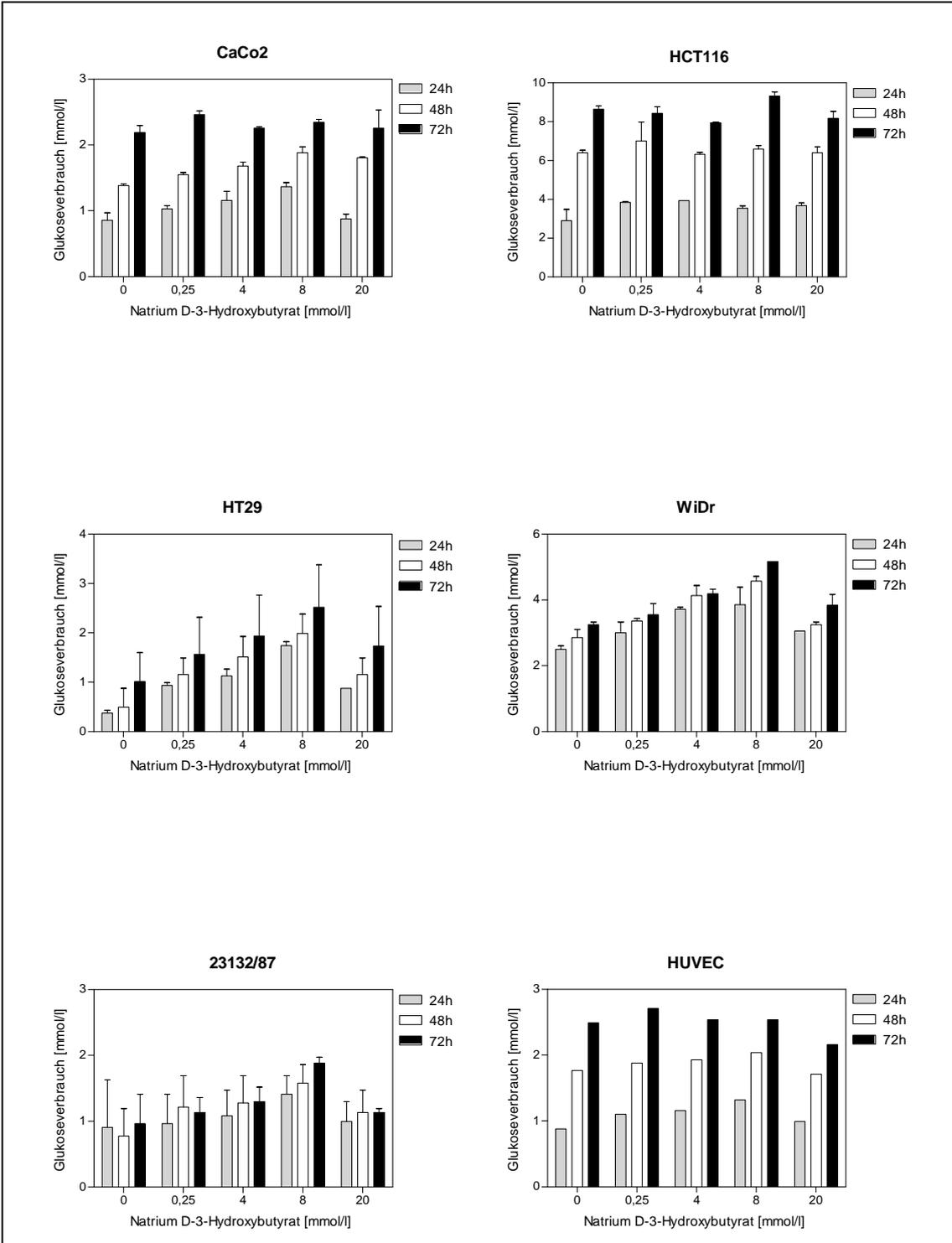


Abb. 10.3: Ketonkörper beeinflussen nicht den Verbrauch von Glukose bei 5 % Sauerstoff. Für weitere Informationen siehe Abb. 4.10. Zu SW620 (Leibovitz-Medium) siehe auch Tab. 10.1.

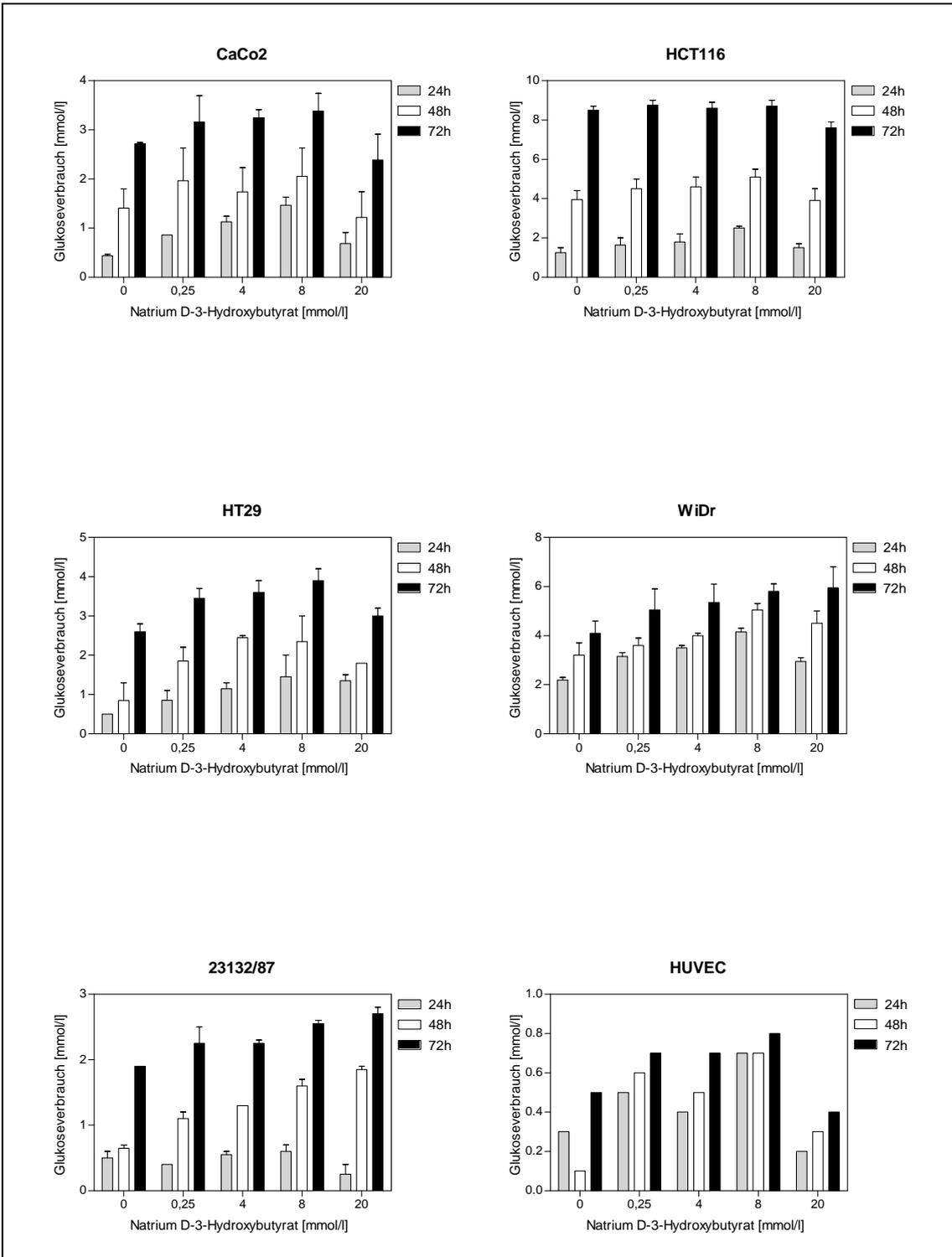


Abb. 10.4: Ketonkörper beeinflussen nicht den Verbrauch von Glukose bei 21 % Sauerstoff. Für weitere Informationen siehe Abb. 4.10. Zu SW620 (Leibovitz-Medium) siehe auch Tab. 10.1.

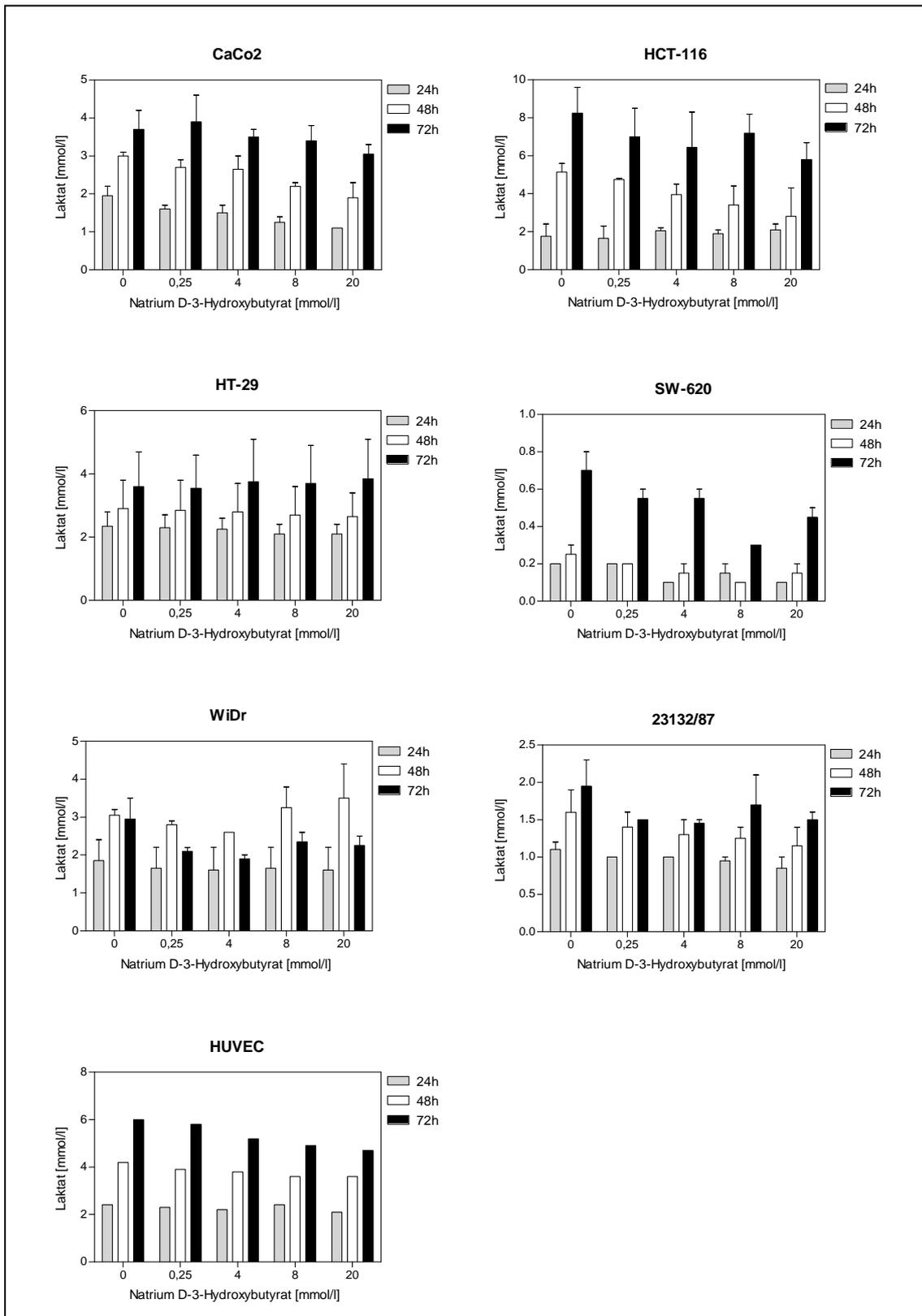


Abb. 10.5: Ketonkörper beeinflussen nicht die Bildung von Laktat bei 5 % Sauerstoff. Für weitere Informationen siehe Abb. 4.11. Zu SW620 (Leibovitz-Medium) siehe auch Tab. 10.1.

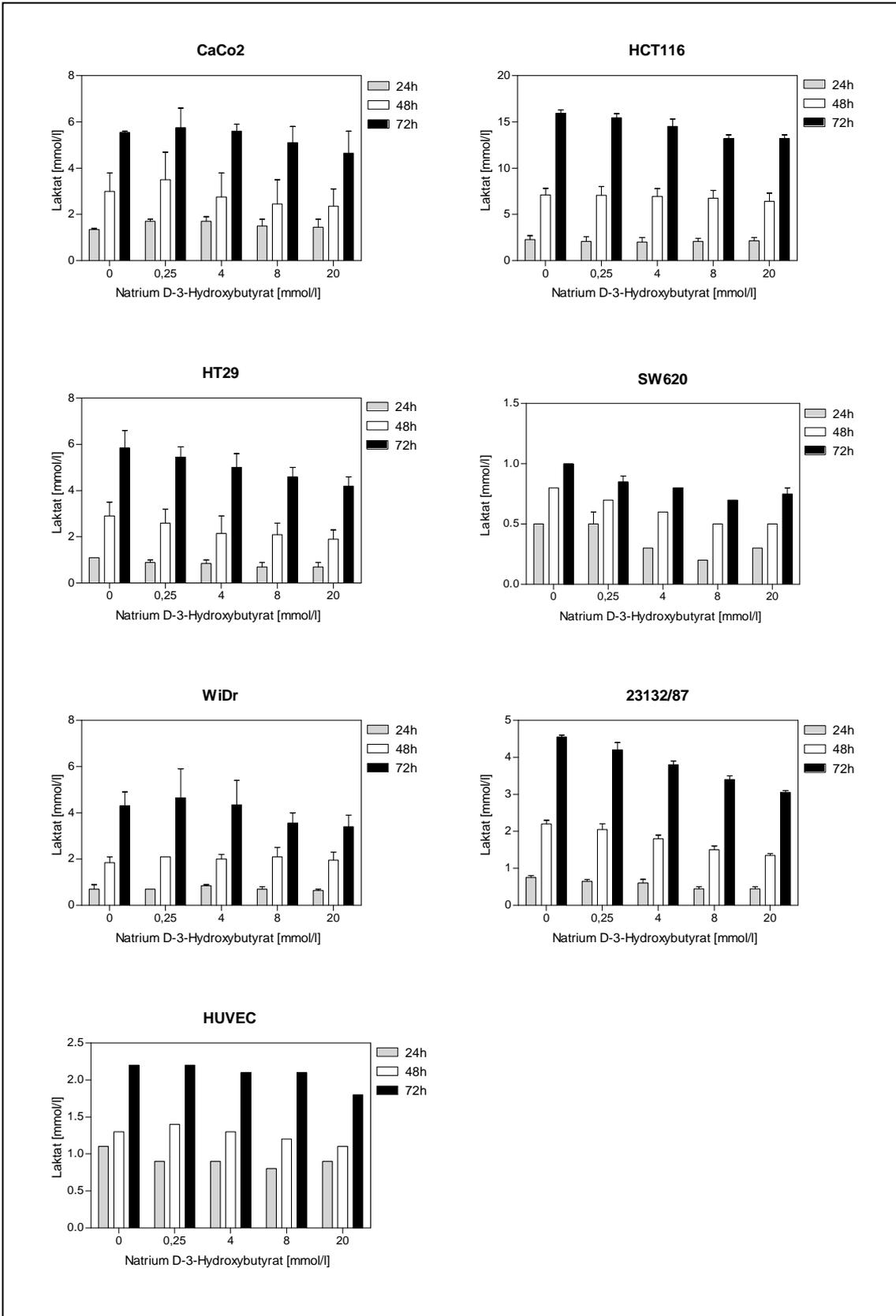


Abb. 10.6: Ketonkörper beeinflussen nicht die Bildung von Laktat bei 21 % Sauerstoff. Für weitere Informationen siehe Abb. 4.12.

Tab.10.4: Glukoseverbrauch und Laktatbildung bei 1 % Sauerstoff für die Karzinomzelllinie HCT116. Ketonkörper beeinflussen weder den Verbrauch von Glukose noch die Bildung von Laktat. In der Klammer ist das Verhältnis von Glukoseverbrauch zu Laktatbildung angegeben. Der theoretische Wert beträgt 1: 2. Angaben in mmol/l; siehe auch Abb. 4.10 und 4.11.

Ketonkörper	Glukoseverbrauch		Laktatbildung	
	48h	72h	48h	72h
0	5,4±1,49	8,2±0,67	10,7±3,3 (1:2,0)	17,8±4,17 (1:2,2)
0,25	5,8±1,29	8,5±0,75	10,7±,2 (1:1,8)	16,7±4,9 (1:2,0)
4,0	6,1±1,50	8,1±1,41	10,4±3,2 (1:1,7)	16,3±3,8 (1:2,0)
8,0	6,5±1,49	8,1±1,53	10,3±3,3 (1:1,6)	17,5±0,92 (1:2,2)
20	5,6±2,00	8,2±0,43	11,2±3,6 (1:2,0)	18,1±2,33 (1:2,2)

Tab.10.5: Glukoseverbrauch und Laktatbildung bei 1 % Sauerstoff für die Karzinomzelllinie WiDr. Ketonkörper beeinflussen weder den Verbrauch von Glukose noch die Bildung von Laktat. In der Klammer ist das Verhältnis von Glukoseverbrauch zu Laktatbildung angegeben. Der theoretische Wert beträgt 1: 2. Angaben in mmol/l; siehe auch Abb. 4.10 und 4.11.

Ketonkörper	Glukoseverbrauch		Laktatbildung	
	48h	72h	48h	72h
0	3,5±0,23	5,8±0,04	6,0±2,61 (1:1,7)	11,3±1,34 (1:2,0)
0,25	3,9±0,16	5,8±0,21	5,8±2,33 (1:1,5)	10,5±0,78 (1:1,8)
4,0	4,0±0,06	5,5±0,10	5,7±2,48 (1:1,4)	10,9±,07 (1:2,0)
8,0	4,4±0,24	6,0±0,18	5,6±2,62 (1:1,3)	11,1±0,35 (1:1,9)
20	3,7±0,09	5,4±0,35	5,6±2,62 (1:1,5)	11,2±0,35 (1:2,1)

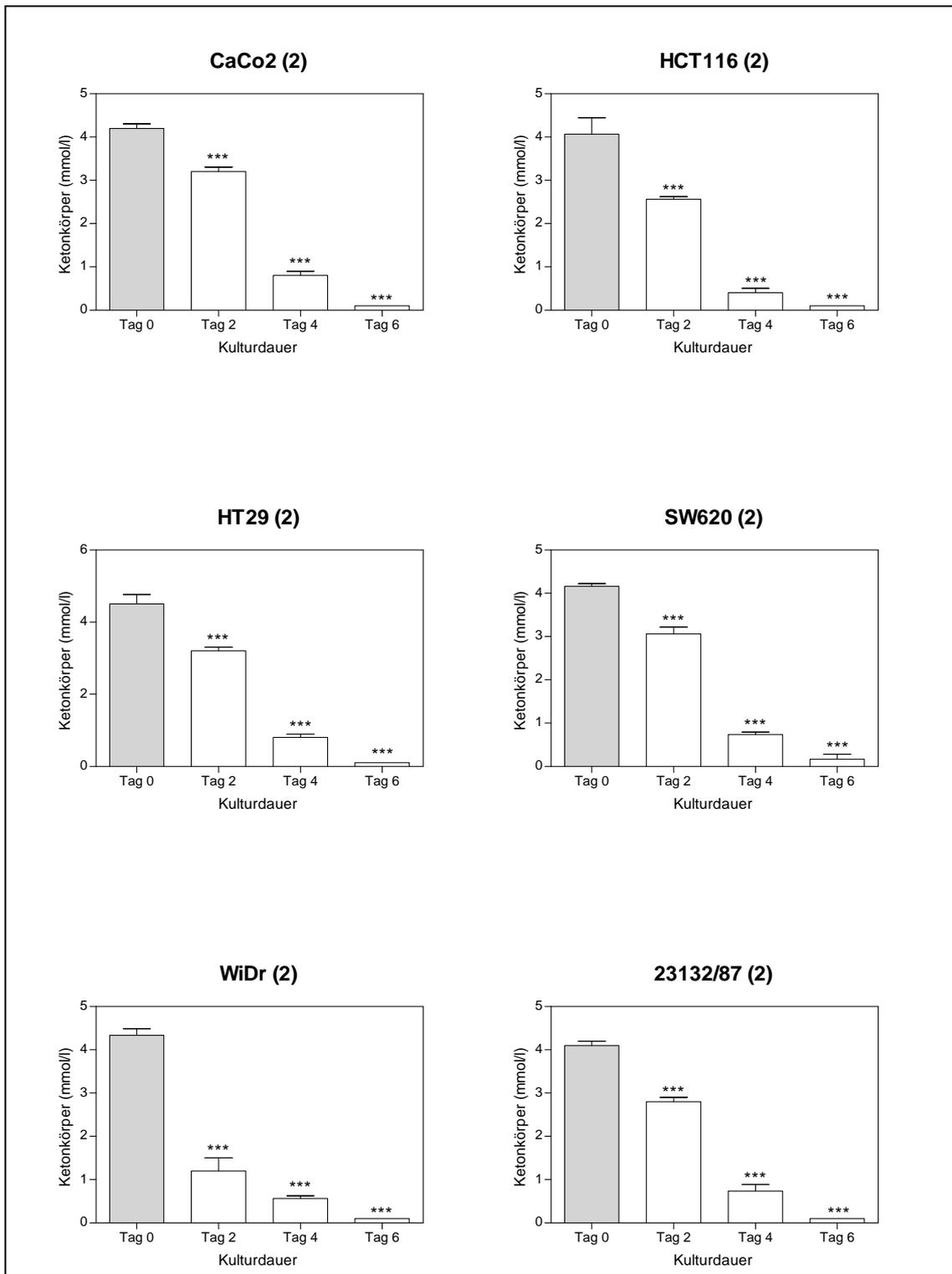


Abb. 10.7: Nachweis der Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 21 % Sauerstoff. Die Kulturen wurden mit 4 mmol/l Natrium D-3-Hydroxybutyrat (Endkonzentration) versetzt, und alle zwei Tage wurde der Anteil an Ketonkörper im Zellkulturüberstand bestimmt. Jede Messung wurde 2-mal durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Für diese Messungen wurden die Zellen in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 2 mmol/l Glukose kultiviert (Tab. 3.2). *** $P < 0.001$, ANOVA mit Benferroni-Korrektur. Siehe auch Ergebnisse mit 11 mmol/l Glukose in Abb. 4.6.

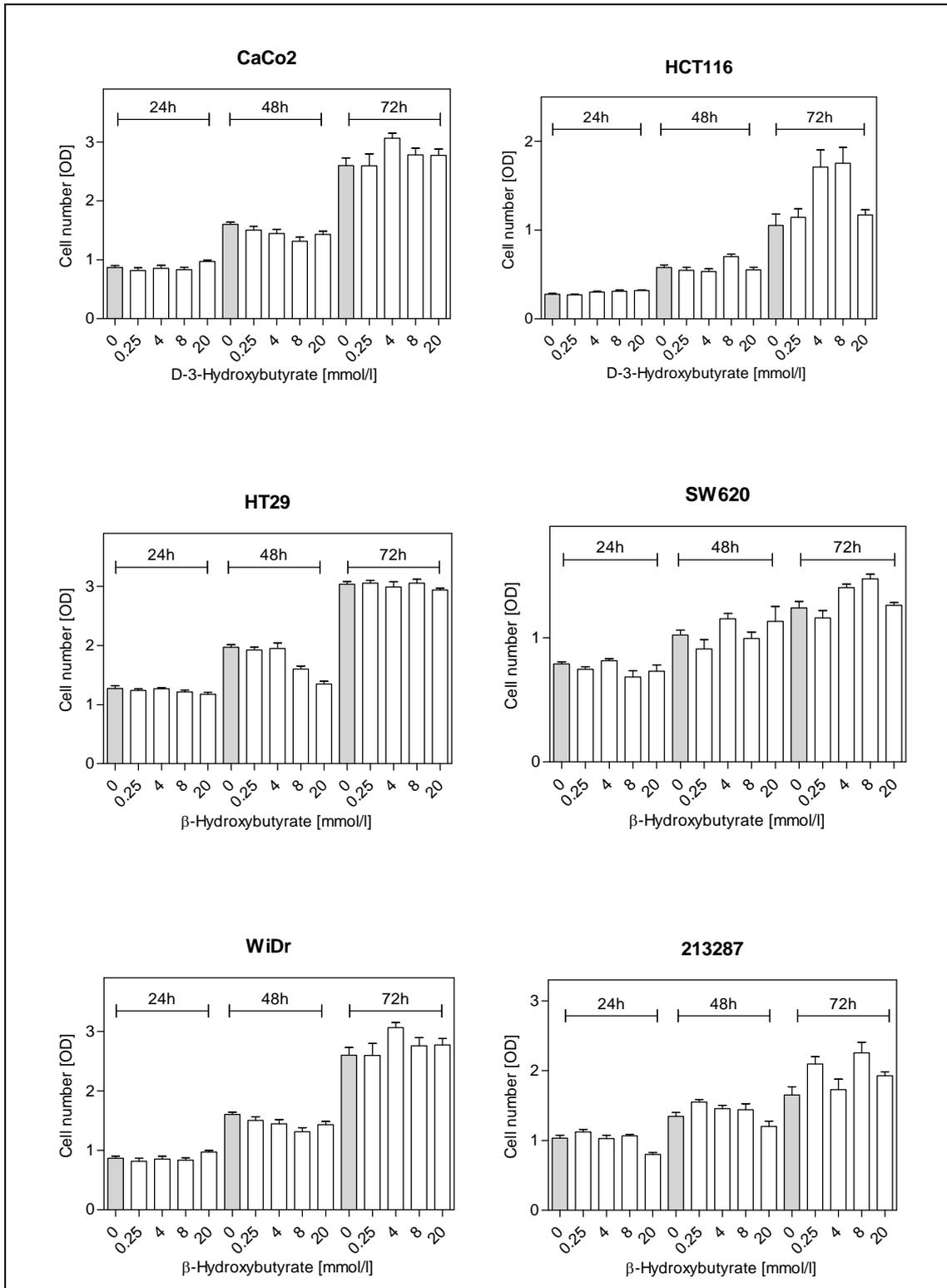


Abb. 10.8: Der Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat auf das Zellwachstum bei 21 % Sauerstoff. Fünf gastrointestinale Zelllinien (CaCo2, HCT116, HT29, SW620 und WiDr), eine Magenkarzinomzelllinie (2132/87) und Endothelzellen (HUVEC) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ketonkörper (0,25 bis 20 mmol/l) inkubiert. Für diesen Versuch wurde D-3-Hydroxybuttersäure verwendet. Die Zellen wurden bis zu 72 Stunden in ihrem empfohlenen Medium (Abb. 3.2) inkubiert. Die Messwerte vom KV-Assay sind als Mittelwert \pm Standardabweichung einer repräsentativen Versuchsserie mit jeweils 6 Parallelwerten dargestellt.

11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	2
The Hallmarks of Cancer.	
Abb. 3.1:	15
Versuchsaufbau zum Nachweis proliferationsfördernder Eigenschaften von Ketonkörper.	
Abb. 4.1:	23
Verdopplungszeiten.	
Abb. 4.2:	24
Der Einfluss von Sauerstoff auf das Zellwachstum.	
Abb. 4.3:	26
Der Einfluss von Ketonkörper auf das Zellwachstum bei 21 % Sauerstoff.	
Abb. 4.4:	28
Der Einfluss von Ketonkörper auf das Zellwachstum bei 5 % Sauerstoff.	
Abb. 4.5:	29
Der Einfluss von Ketonkörper auf das Zellwachstum bei 1 % Sauerstoff.	
Abb. 4.6:	32
Nachweis der Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 21 % Sauerstoff.	
Abb. 4.7:	33
Nachweis der Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 21 % Sauerstoff. Kontrollversuch-1 mit fixierten Zellen.	
Abb. 4.8:	34
Nachweis der Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 21 % Sauerstoff. Kontrollversuch-2 mit zellfreien Kulturen.	
Abb. 4.9:	34
Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 5 % (A) und 1 % (B) Sauerstoff.	
Abb. 4.10:	36
Ketonkörper beeinflussen nicht den Verbrauch von Glukose bei 1 % Sauerstoff.	
Abb. 4.11:	37
Ketonkörper beeinflussen nicht die Bildung von Laktat bei 1 % Sauerstoff.	

Abb. 4.12:	38
Nachweis der Expression der an der Ketolyse beteiligten Enzyme und von D-3-HBD.	
Abb. 10.1:	60
Der Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat auf das Zellwachstum bei 21 % Sauerstoff (Versuchsserie 2).	
Abb. 10.2:	61
Der Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat auf das Zellwachstum bei 1 % Sauerstoff (Versuchsserie 2).	
Abb. 10.3:	62
Ketonkörper beeinflussen nicht den Verbrauch von Glukose bei 5 % Sauerstoff.	
Abb. 10.4:	63
Ketonkörper beeinflussen nicht den Verbrauch von Glukose bei 21 % Sauerstoff.	
Abb. 10.5:	64
Ketonkörper beeinflussen nicht die Bildung von Laktat bei 5 % Sauerstoff.	
Abb. 10.6:	65
Ketonkörper beeinflussen nicht die Bildung von Laktat bei 21 % Sauerstoff.	
Abb. 10.7:	67
Nachweis der Verstoffwechslung von Ketonkörper bei 21 % Sauerstoff.	
Abb. 10.8:	68
Der Einfluss von D-3-Hydroxybutyrat auf das Zellwachstum bei 21 % Sauerstoff.	

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	8
Die an der Ketogenese beteiligten Enzyme.	
Tab. 1.2:	10
Die an der Ketolyse beteiligten Enzyme.	
Tab. 3.1:	13
Übersicht der untersuchten humanen Zelllinien.	
Tab. 3.2:	14
Übersicht der verwendeten Kulturmedien.	
Tab. 3.3:	16
Ketonkörperspiegel und die entsprechende Stoffwechselsituation.	
Tab. 3.4:	21
Informationen zu den Primer Paaren.	
Tab. 3.5:	21
Übersicht zur Qualität der qPCR.	
Tab. 10.1:	58
Überprüfung der Genauigkeit zur Bestimmung von Glukose und Laktat in den verschiedenen Kulturmedien (Tab. 3.2) mit dem Cobas 8000 Modular Analyse System (Roche Diagnostics, Mannheim).	
Tab. 10.2:	58
Bestimmung von Ketonkörper in verschiedenen Kulturmedien.	
Tab. 10.3:	59
Bestimmung der Zellverdopplung bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen.	
Tab. 10.4:	66
Glukoseverbrauch und Laktatbildung bei 1 % Sauerstoff für die Karzinomzelllinie HCT116.	
Tab. 10.5:	66
Glukoseverbrauch und Laktatbildung bei 1 % Sauerstoff für die Karzinomzelllinie WiDr.	

Danksagung

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

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

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

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern.

Curriculum Vitae

Persönliches

Name Heidari-Movahed, Marjam

Studium

11/2013 Staatsexamen

04/2008 – 11/2013 Studium Zahnmedizin

Würzburg,