

Aus der Frauenklinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Achim Wöckel

**Wachstumsverhalten, Chemo- und Radiosensitivität ausgewählter  
Brustkrebszellen werden durch Betahydroxybutyrat nicht beeinflusst.**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Julius- Maximilians- Universität Würzburg

vorgelegt von

Katrin Bahlke

aus Kahl am Main

Würzburg, September 2020



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

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

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

**Tag der mündlichen Prüfung:** 22.04.2021

**Die Promovendin ist Ärztin.**

**Meinen Eltern.**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Einführung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Das Mammakarzinom .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Grundlagen und Klassifikation .....	2
1.2.2 Therapie .....	4
1.2.3 Zytostatika.....	5
<b>1.3 Besonderheiten im Stoffwechsel maligner Tumoren.....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Allgemeiner Zellstoffwechsel.....	6
1.3.2 Blutzucker .....	12
1.3.3 Hypoxie .....	14
<b>1.4 Ketogene Diät.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Ketonkörper und der Fastenstoffwechsel.....</b>	<b>16</b>
<b>1.6 Fragestellung .....</b>	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Verwendete Materialien.....</b>	<b>22</b>
2.1.1 Zelllinien .....	22
2.1.2 Chemikalien .....	22
2.1.3 Medien .....	23
2.1.4 Zytostatika.....	24
2.1.5 Verbrauchsmaterial .....	24
2.1.6 Geräte .....	25
2.1.7 Software .....	26
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.2.1 Zellkulturmethoden.....	26

2.2.2	Experimentelles Design .....	28
2.2.2.1	Colony Forming Test.....	28
2.2.2.2	Methoden der Chemosensitivitätstestungen.....	29
2.2.2.3	Ketonkörpernachweis bei Chemosensitivitätstestungen.....	32
2.2.2.4	Glukose- und Laktatmessung .....	33
2.2.2.5	Wachstumsvergleich 3-OHB / G5-Medium .....	33
2.2.2.6	Methoden der Radiosensitivitätstestung .....	34
2.2.3	Methoden der Quantifizierung vitaler Zellen .....	35
2.2.3.1	WST-8-Test.....	35
2.2.3.2	Kristallviolett-Test.....	36
2.2.3.3	BrdU-Test.....	36
2.2.4	Auswertung und Statistik.....	38
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Wachstumsvergleich 3-OHB / G5-Medium .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Glukoseverbrauch und Laktatbildung .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Konzentration und Verbrauch von 3-OHB.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Radiosensitivitätstestungen.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Chemosensitivitätstestungen.....</b>	<b>49</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeine Wachstumshemmung .....</b>	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b>Energetisches Profil .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3</b>	<b>Einfluss auf Radiotherapie .....</b>	<b>62</b>
<b>4.4</b>	<b>Einfluss auf Chemotherapie .....</b>	<b>65</b>
<b>4.5</b>	<b>Ketogene Diät als sinnvolle, unbedenkliche Ergänzung? .....</b>	<b>67</b>

<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>71</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>72</b>
<b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>94</b>
<b>8. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>
<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	
<b>DANKSAGUNG .....</b>	

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

Brustkrebs ist die mit Abstand häufigste maligne Erkrankung der Frau. Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts erkranken in Deutschland jährlich rund 70 000 Frauen an einem Mammakarzinom, fast ein Drittel davon erhält die Diagnose noch vor dem 55. Lebensjahr (1). Das Risiko für eine Frau, im Laufe ihres Lebens einen malignen Tumor der Brust zu entwickeln, liegt im Schnitt bei 12,2 %, das Sterberisiko bei 3,6 %. Ebenso können Männer von Brustkrebs betroffen sein, auch wenn das Lebenszeitrisko hier mit 0,1 % deutlich niedriger liegt (1).

Trotz der recht hohen Inzidenz gleicht die Diagnosestellung für viele Patientinnen und Patienten einer Schocksituation. Neben Angst und Verdrängung kommt es oft auch zur Reflektion des bisherigen Lebens und zur Entwicklung einer subjektiven Krankheitstheorie (2). Viele Betroffene stellen ihr Verhalten und ihren Lebensstil in der Vergangenheit in Frage und suchen nach neuen Ansätzen, diesen im Angesicht der Diagnose zu verändern. Wichtige Themen sind dabei beruflicher und privater Stress sowie der Umgang mit Problemen, aber auch die Ernährung als fester Bestandteil des Alltags nimmt eine bedeutende Rolle ein (2, 3). Hinzu kommt, dass die Betroffenen oft einen Kontrollverlust und eine gewisse Ohnmacht gegenüber der Krankheit erleben (4). Sie unterziehen sich zwar einer Therapie, können die verschiedenen Behandlungen jedoch nur passiv über sich ergehen lassen. Ihre Ernährung dagegen können sie selbst steuern, damit aktiv ihr Wohlbefinden verbessern und vielleicht sogar gegen den Brustkrebs ankämpfen. Da daraus letztlich emotionale Stabilität sowie eine gesteigerte Lebensqualität resultieren können (5), wären klare Diättempfehlungen bei Patientinnen und Patienten mit Mammakarzinom ein denkbarer supportiver Therapieansatz.

## **1.2 Das Mammakarzinom**

### **1.2.1 Grundlagen und Klassifikation**

Die weibliche Brust besteht im Wesentlichen aus Drüsengewebe, welches in Fettgewebe sowie stützendes Bindegewebe eingebettet ist. Die kleinen Drüsenläppchen (Lobuli) münden in Milchgänge (Ducti), die schließlich zur Brustwarze führen.

Bei Brustkrebs handelt es sich um eine ebenso häufige wie vielseitige Tumorentität. Wie bei den meisten anderen Krebsarten gibt es zahlreiche Unterformen, die wiederum unterschiedlicher Therapien bedürfen. Allen gemeinsam ist die Entartung von Brustgewebe, was zu einem gesteigerten und unkontrollierten Wachstum der Krebszellen auf Kosten des gesunden Gewebes führt.

Der Tumorherd kann an verschiedenen Stellen in der Brust sitzen, sodass man histopathologisch zunächst zwischen Geschwülsten duktales und lobulären Ursprungs unterscheidet: duktales Tumoren gehen von den Milchgängen der Brustdrüse aus, lobuläre dagegen von den Drüsenläppchen. Während das „Invasiv Duktale Karzinom“ (IDC) mit 40-75 % die häufigste Form des Brustkrebs darstellt, treten lobuläre Karzinome und andere Sonderformen deutlich seltener auf (6). Zudem sind auch nicht-invasive Frühformen wie das „Duktale In-Situ-Karzinom“ (Duktales Karzinoma in situ, DCIS) oder die „Lobuläre intraepitheliale Neoplasie“ (LIN) mögliche Erscheinungsbilder einer Entartung. Wichtig für die weitere Einteilung eines Mammakarzinoms sind zudem Tumorgröße, -stadium und -differenzierung. Auch auf immunhistochemischer Ebene lassen sich Krebszellen nochmals unterteilen, was für die Wahl der Therapie von großer Bedeutung ist. Wichtige Gesichtspunkte für die Klassifikation sind die Expression von Hormon- (Östrogen, Progesteron) und Wachstumsrezeptoren (HER2; Human Epidermal Growth Factor 2) sowie die mittels Ki-67 messbare Proliferationsrate eines Tumors. In Tabelle 1 sind die Charakteristika der verschiedenen molekularen Subtypen (7, 8) und deren Therapieansätze gemäß der St. Gallen Konvention und S3-Leitlinie vereinfacht zusammengestellt (9-11).

Subtyp	Klinisch-pathologische Definition	Empfohlene systemische Therapie
<b>Luminal A</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER und/oder PR positiv</li> <li>• HER2 negativ</li> <li>• Ki-67 niedrig (&lt; 14 %)</li> </ul>	Endokrine Therapie; ggf. +Chemotherapie
<b>Luminal B</b> (HER2 negativ)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER und / oder PR positiv</li> <li>• HER2 negativ</li> <li>• Ki-67 hoch</li> </ul>	Endokrine Therapie; meist +Chemotherapie
<b>Luminal B</b> (HER2 positiv)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER und / oder PR positiv</li> <li>• HER2 überexprimiert oder amplifiziert</li> <li>• Jedes Ki-67</li> </ul>	Chemotherapie +Endokrine Therapie +Anti-HER2-Therapie
<b>HER2 positiv</b> (nicht luminal)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER und PR negativ</li> <li>• HER2 überexprimiert oder amplifiziert</li> </ul>	Chemotherapie +Anti-HER2-Therapie
<b>Basal-like</b> (Triple negativ; duktal)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER und PR negativ</li> <li>• HER2 negativ</li> </ul>	Chemotherapie

*Tabelle 1: Einteilung der Mammakarzinom-Subtypen gemäß der St. Gallen-Klassifikation.*

*ER: Östrogenrezeptor, PR: Progesteronrezeptor, HER2: Human Epidermal Growth Factor 2*

Im Laufe der Jahre konnten zahlreiche Zelllinien aus malignen (Pleura-) Ergüssen von Brustkrebspatientinnen mit fortgeschrittenen Erkrankungen isoliert werden. Jede dieser Linien lässt sich einem Subtypen (s. Tabelle 1) zuordnen; so auch die drei Zelllinien MCF-7, T47D und BT474, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Es handelt sich um hormonsensitive Zellen und somit um Vertreter der Gruppen Luminal A und B, die im klinischen Alltag etwa 80 % der Mammakarzinome ausmachen (12). Diese Zelllinien bieten in der Regel bessere Heilungschancen als etwa die Zellen vom Basal-like-Typ (12).

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der wichtigsten Merkmale der untersuchten Zelllinien.

Zelllinie	Molekularer Subtyp	Tumortyp	Ursprung	Patientenalter	Wachstumsverhalten	Beschriebene Mutationen
<b>MCF-7</b>	Luminal A	IDC	Pleuraerguss	69	Monolayer	ATP2B3; CDKN2A; EP300; ERBB4; MAP3K13; PIK3CA
<b>T47D</b>	Luminal A	IDC	Pleuraerguss	54	Monolayer	ACVR1; ARID1A; PIK3CA; TP53
<b>BT474</b>	Luminal B, HER2-positiv	IDC	Primärtumor der Mamma	60	Multilayer, kaum konfluent	EPS15; HIST1H3B; NSD1; PIK3CA; PPP2R1A; RHOA; TP53

*Tabelle 2: Steckbriefe der verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien (13-19).*

*IDC: Invasiv Duktales Karzinom, HER2: Human Epidermal Growth Factor 2.*

### 1.2.2 Therapie

Die klassische Therapie des Mammakarzinoms fußt auf den drei Säulen der (I) chirurgischen Tumorexzision, (II) der Bestrahlung (Radiatio) und (III) der systemischen Therapie. Ob und in welcher Kombination bzw. Reihenfolge diese drei Therapieverfahren durchlaufen werden, muss stets für jede Patientin individuell in Abhängigkeit der Tumorgöße, -lokalisation, -differenzierung und -immunhistochemie entschieden werden (11).

Die systemische Therapie wird meist adjuvant angewendet und besteht aus drei möglichen Komponenten, die sich entsprechend der histologischen Subtypen ergeben (s. Tabelle 1). Sie umfasst die endokrine Therapie, die Chemotherapie und die Gabe von spezifischen Antikörpern.

Fehlen beispielsweise jegliche Rezeptoren als Therapietarget, so wird auf eine (neo-) adjuvante Chemotherapie zurückgegriffen. Entsprechend der Empfehlung der St. Gallen Konferenz 2017 kann eine Chemotherapie aus Anthrazyklinen (z.B. Epirubicin) oder Taxanen (z.B. Paclitaxel) bestehen (10), wie sie daher auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Zudem besteht gerade bei Basal-like Typen die Möglichkeit, eine platinhaltige Chemotherapie zu verabreichen (10). Daher wurde in den vorliegenden Versuchen auch Carboplatin verwendet. Im Folgenden sollen die drei eingesetzten Chemotherapeutika genauer vorgestellt werden.

### **1.2.3 Zytostatika**

#### Epirubicin

Epirubicin ist eine oft eingesetzte und synthetisch hergestellte Substanz aus der Stoffgruppe der Anthrazykline. Diese enthalten typischerweise Chinon- und Hydrochinon-Gruppen und vermitteln eine Reihe zytotoxischer Effekte, auch wenn ihr Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Zum einen interkalieren sie mit der DNA, indem sie sich zwischen die Basen schieben und so die Synthese neuer DNA und RNA behindern. Zum anderen kommt es durch Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite sowie durch Komplexbildung mit der Topoisomerase II zu DNA-Strangbrüchen. Somit wirkt Epirubicin vor allem auf sich teilende Zellen in der S- und G2-Phase des Zellzyklus und eignet sich im klinischen Alltag gut zur Therapie solider Tumore (20).

#### Paclitaxel

Da Taxane ebenfalls in den aktuellen Therapieempfehlungen zu finden sind, wird häufig Paclitaxel als Vertreter dieser Gruppe verwendet. Taxane sind Spindelgifte, die ursprünglich aus der pazifischen Eibe gewonnen wurden. Sie greifen während der Zellteilung in die Mikrotubuli-Reorganisation ein und verhindern deren Depolarisation. Dies hat durch die Entstehung atypischer, nicht verwertbarer Mikrotubuli, die keine funktionsfähige Mitosespindel formieren können, eine Blockade des Zellzyklus in der M-Phase zur Folge. Da lediglich

Zellen beeinflusst werden, die sich im Teilungsprozess befinden, ist ein therapeutischer Nutzen vor allem bei schnell proliferierenden Tumoren gegeben (21, 22).

### Carboplatin

Bei tripel-negativen Mammakarzinomen empfiehlt die St. Gallen Konferenz zusätzlich Alkylanzien. Eine oft gewählte Substanz ist hier das Carboplatin, welches aufgrund seines zentralen Platinatoms zu den Platinkomplexen zählt. Nachdem diese intrazellulär in ihre aktive Form überführt wurden, vermitteln Platinkomplexe über Reaktionen mit den Basen Guanin und Adenin eine Quervernetzung der DNA. Dadurch kommt es zu Intra-Strangbindungen, die ihrerseits zu einem Abbruch der Replikation führen. Zudem wird von Punktmutationen sowie von einer Hemmung der DNA- Reparatursysteme und der Telomeraseaktivität berichtet. Ein großer Vorteil der Platinkomplexe besteht darin, dass sie phasenunspezifisch, also unabhängig vom Zellzyklus, in jeder Zyklusphase wirksam sind. Abgesehen vom Mammakarzinom findet Carboplatin vor allem bei der Therapie von Tumoren des Urogenitaltraktes Anwendung (22).

## **1.3 Besonderheiten im Stoffwechsel maligner Tumoren**

### **1.3.1 Allgemeiner Zellstoffwechsel**

Um mögliche weitere Angriffspunkte in der Tumorthherapie zu identifizieren, soll der Stoffwechsel von gesunden sowie malignen Zellen genauer beleuchtet werden. Grundlage jeglichen Zellwachstums ist die Deckung des zellulären Energiebedarfs; um ihre Struktur sowie die zahlreichen biochemischen Vorgänge und Funktionen aufrechtzuerhalten, benötigt eine jede Zelle Energie in ausreichender Menge und adäquater Darreichungsform. Im menschlichen Körper wird die zelluläre Energieversorgung über die Aufnahme von Makronährstoffen in der Nahrung sichergestellt. Diese werden im Gastrointestinaltrakt verdaut, das heißt in ihre Bestandteile zerlegt und ins Blut aufgenommen. Besonders schnell wird dieser Weg von Kohlenhydraten durchlaufen, die den Zellen anschließend in Form von Traubenzucker (Glukose)

zur Verfügung stehen. Die Glukose kann nun über Glukosetransporter (GLUT) in die Zellen aufgenommen und in deren Zytosol der Glykolyse zugeführt werden, wo sie in mehreren Schritten zu Pyruvat verstoffwechselt wird

(Glukose + 2 NAD<sup>+</sup> + 2 ADP + 2 P<sub>i</sub> → 2 Pyruvat + 2 NADH/H<sup>+</sup> + 2 ATP + 2 H<sub>2</sub>O)  
(23, S. 183-90).

Das weitere Schicksal des Pyruvats hängt von der aktuellen Sauerstofflage der Zelle ab. In Anwesenheit von genügend O<sub>2</sub> wird es durch die Pyruvatdehydrogenase in Acetyl-CoA umgewandelt, in die Mitochondrien transportiert und dort in den Zitratzyklus eingeschleust. Bei dessen Durchlaufen entstehen Redoxäquivalente wie NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub>, die wiederum in der Atmungskette reoxidiert werden und so zur ATP-Synthese dienen. Dieser Prozess der oxidativen Phosphorylierung kann jedoch in einer anaeroben Stoffwechsellage nicht ablaufen. Stattdessen wird in diesem Fall das Pyruvat mithilfe der Laktatdehydrogenase (LDH) durch Fermentation in Laktat umgewandelt, was zwar weniger Zeit in Anspruch nimmt, dafür aber keine zusätzliche Energie liefert (Pyruvat + NADH/ H<sup>+</sup> ↔ Laktat + NAD<sup>+</sup>). Dieser Weg ist notwendig, um Redoxäquivalente (NAD<sup>+</sup>) zu regenerieren, welche ubiquitär in der Zelle benötigt werden, aber nicht unbegrenzt nachgebildet werden können. Während durch oxidative Phosphorylierung etwa 30 Moleküle ATP pro Glukosemolekül entstehen, kann beim anaeroben Weg nur ein Energiegewinn von 2 Molekülen ATP aus der Glykolyse verzeichnet werden (Glukose + 2 ADP + 2 P<sub>i</sub> → 2 Lactat + 2 ATP) (23, S. 183-90).

Gesunde Zellen sind in der Lage, je nach Sauerstoffangebot zwischen den beiden Stoffwechselwegen zu wechseln. In der Mehrzahl der Fälle ist jedoch genügend Sauerstoff vorhanden, sodass der Weg der oxidativen Phosphorylierung eingeschlagen wird. Der Pasteur-Effekt beschreibt sogar, dass die Anwesenheit von Sauerstoff die Fermentation zu Laktat hemmt (24).

In Tumorzellen hingegen verhält es sich anders: Selbst bei ausreichender Sauerstoffversorgung läuft die Fermentation nahezu ungehindert auf hohem Niveau weiter. Diese „aerobe Glykolyse“ wird nach ihrem Entdecker Otto Warburg auch als „Warburg Effekt“ bezeichnet und über verschiedene Prozesse

vermittelt. Zum einen kommt es durch häufige Überexpression der Glukosetransporter (25-28) zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme in die Zelle (29). Zum anderen wird durch überexprimiert vorliegende Laktattransporter (Monocarboxylattransporter, MCT) (30-33) vermehrt Laktat aus der Zelle geschleust und es liegt eine extrazellulär erhöhte Laktatkonzentration vor (34). Auch Schlüsselenzyme der Glykolyse, wie die Hexokinase und Pyruvatkinase, werden dabei oft hochreguliert (35-38), bzw. die entsprechenden Gene dafür überexprimiert (39). Dieser massive Glukoseuptake und –umsatz, der sich auch mittels FDG-PET-Scans messen lässt (40), korreliert in seinem Ausmaß oftmals mit der Aggressivität eines Tumors (27, 28, 41-43). Die gesteigerte glykolytische Aktivität führt dazu, dass anfallendes Glukose-6-Phosphat vermehrt dem Pentosephosphatweg zugeführt werden kann. Im oxidativen Teil dieses Stoffwechselweges entsteht dabei Ribulose-5-Phosphat, welches in der DNA- und RNA-Synthese als grundlegender Baustein dient (23, S. 183-90). Weiteren Nutzen kann die Zelle zudem aus der Bildung von NADPH im Pentosephosphatweg ziehen, da NADPH als Elektronendonator für die Reperation von Glutathion (GSH) aus seiner oxidierten Form (GS-SG) fungiert. Das Glutathion wiederum schützt die Zelle nun als Antioxidans vor Sauerstoffradikalen und oxidativem Stress (23, S.254-56). Dies ist von elementarer Bedeutung, da in Karzinomzellen häufig mitochondriale Alterationen vorliegen (44, 45) und sie konstitutiv erhöhten Spiegeln freier Radikale ausgesetzt sind (46). Durch Umgehung der oxidativen Phosphorylierung und somit der Atmungskette kann die Tumorzelle zudem die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eindämmen. Darüber hinaus kann das vermehrt gebildete NADPH als Redoxäquivalent in der Fettsäuresynthese der Tumorzellen genutzt werden und auch das C3-Kohlenstoffatom für die Synthese der Fettsäure-Ketten kann aus Glukose gewonnen werden (47).

Einen weiteren Vorteil der aeroben Glykolyse birgt die gesteigerte Säureproduktion in Form von Laktat (48). Das im Tumorgewebe vermehrt anfallende Laktat (34) wird über MCT-Transporter in den Extrazellularraum geschleust, wo es für eine Ansäuerung des umliegenden gesunden Gewebes sorgt und dort die Tumorinvasion und Gewebsalteration erleichtert (48-50).

Zusätzlich werden durch die hohen Laktatkonzentrationen zytotoxische T-Lymphozyten in ihrer Funktion als Zytokinbildner und Zelltodinduktoren gehemmt (51) und auch dendritische Zellen in ihrer Entwicklung gestört (52). Die Tumorzelle profitiert also gleich mehrfach von ihrem abnormen Stoffwechsel: sie sichert sich eine schnelle Energieversorgung, eine hohe Proliferationsrate sowie Invasivität und bleibt gleichzeitig vor dem Immunsystem und freien Radikalen geschützt.

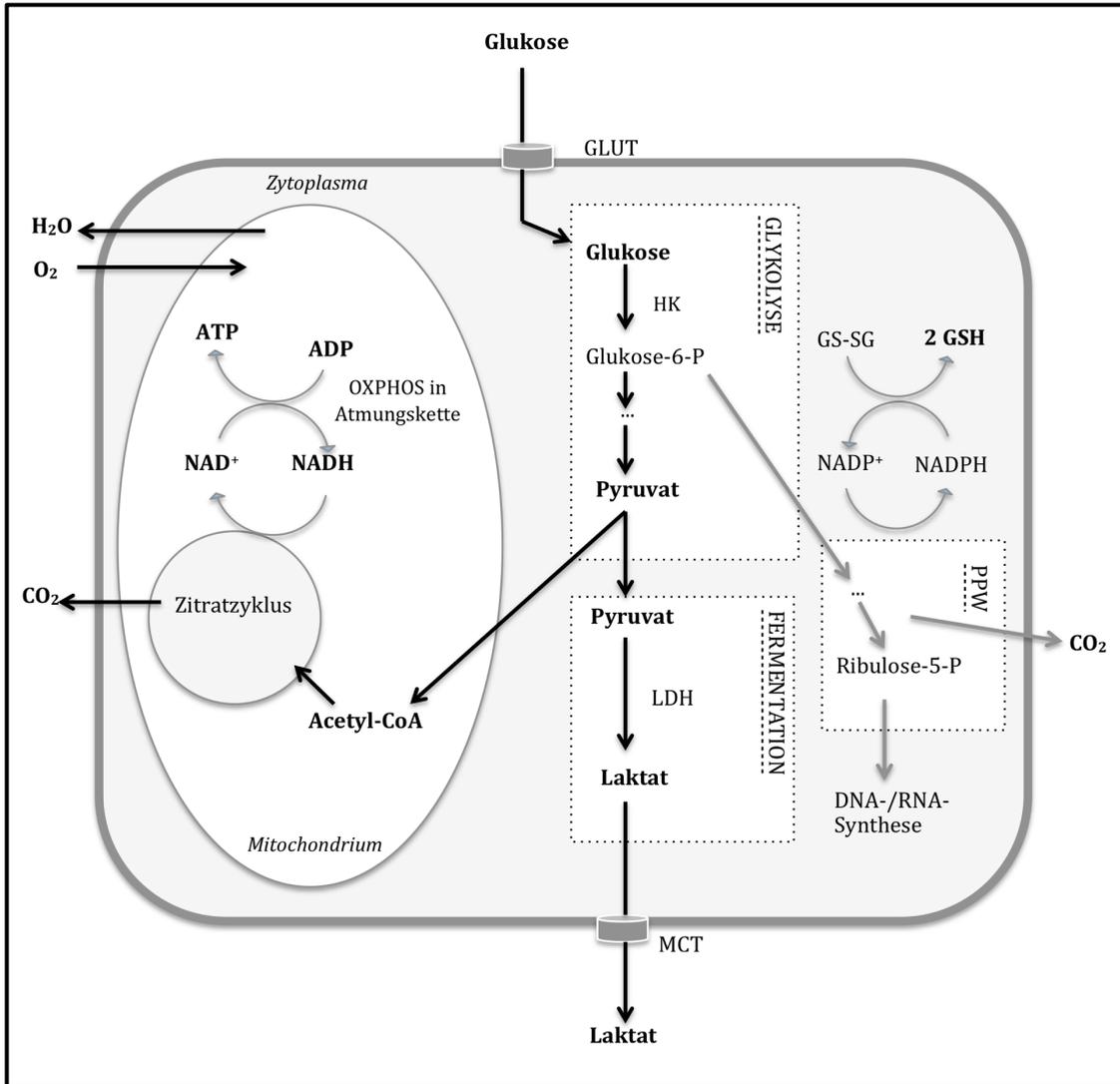


Abbildung 1: Stoffwechsel einer gesunden Zelle.

Glukose wird über Glukosetransporter in die Zelle aufgenommen und in die Glykolyse eingeschleust. Das Endprodukt Pyruvat kann nun je nach Sauerstoffangebot dem Zitratzyklus zugeführt oder zu Laktat fermentiert werden.

GLUT: Glukosetransporter, Glukose-6-P: Glukose-6-Phosphat, LDH: Laktatdehydrogenase, HK: Hexokinase, MCT: Monocarboxylsäure-Transporter, PPW: Pentosephosphatweg, Ribulose-5-P: Ribulose-5-Phosphat, GSH: reduzierte Form von Glutathion, GS-SG: oxidierte Form zweier Glutathion-Moleküle, NADP: Nikotinamidenindinukleotidphosphat, OXPHOS: Oxidative Phosphorylierung. Abbildung modifiziert nach (53).

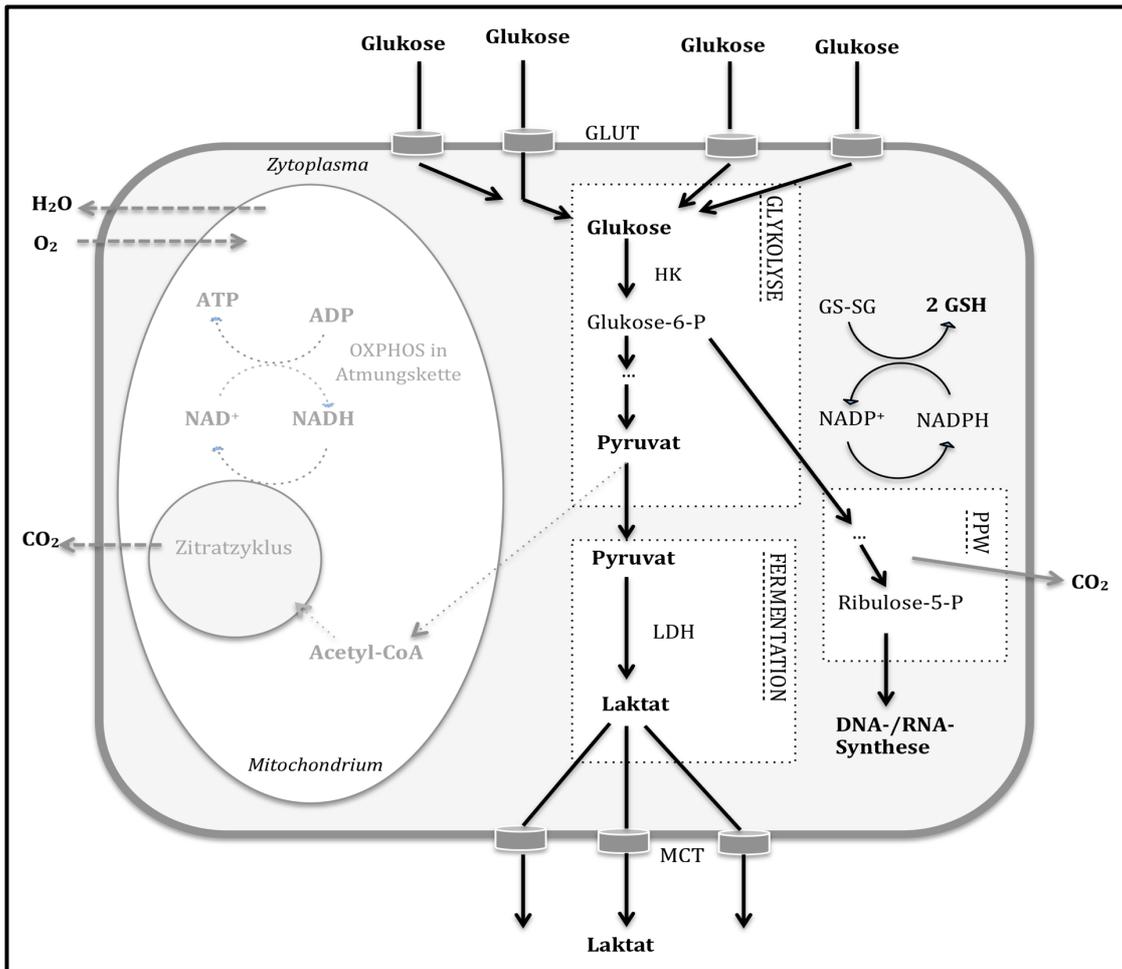


Abbildung 2: Stoffwechsel einer neoplastischen Zelle.

Durch vermehrten Einbau von GLUT in die Zellmembran wird die Glukoseaufnahme gesteigert. Glykolytische Enzyme werden hochreguliert und führen zu verstärkter glykolytischer Aktivität. Pyruvat gelangt kaum noch in den Zitratzyklus. Stattdessen wird es vermehrt zu Laktat fermentiert, welches im Anschluss über MCT-Transporter in den Extrazellularraum gepumpt wird. Glukose-6-Phosphat aus der Glykolyse wird dem Pentosephosphatweg zugeführt, wo Ribulose-5-Phosphat für die DNA-Synthese entsteht. Gleichzeitig wird NADPH gebildet, welches zur Regeneration von Glutathion und als Redoxäquivalent für die Fettsäuresynthese dient. Die nun vermindert ablaufenden Wege sind blass und mit gestrichelten Linien dargestellt.

GLUT: Glukosetransporter, Glukose-6-P: Glukose-6-Phosphat, LDH: Laktatdehydrogenase, HK: Hexokinase, MCT: Monocarboxylsäure-Transporter, PPW: Pentosephosphatweg, Ribulose-5-P: Ribulose-5-Phosphat,

*GSH: reduzierte Form von Glutathion, GS-SG: oxidierte Form zweier Glutathion-Moleküle, , NADP: Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, OXPHOS: Oxidative Phosphorylierung. Abbildung modifiziert nach (53) .*

### **1.3.2 Blutzucker**

Neben dem Nutzen von Glukose für das Wachstum bestehender Tumoren werden chronisch hohe Serumglukosewerte als Risikofaktor für die Entstehung von Neoplasien diskutiert (54-57). Zudem besteht Evidenz, dass hyperglykämische Zustände mit schlechteren Prognosen für Krebspatienten assoziiert sein können (58-64). Grund dafür könnten auch die konsekutiv erhöhten Insulinspiegel sein, die ihrerseits ebenfalls als Risikofaktoren für die Krebsentstehung und -proliferation gelten (65, 66). Bei hohen Blutzuckerwerten sorgen die Wachstumsfaktoren Insulin und IGF1 (Insulin-like Growth Faktor 1) unter anderem für eine Aktivierung der komplexen Onkogenkaskade um PI3-Akt-mTOR (65, 67) und erleichtern dadurch Vorgänge wie Tumorprogression, Metastasierung und Angiogenese (29, 68). Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Regulation besagter Onkogenkaskade. Insbesondere wird die aerobe Glykolyse über diesen Signalweg weiterhin gefördert (73) und neben der Tumorphiliferation kann eine Hyperglykämie Vorgänge wie Antiapoptose und Migration von Krebszellen beeinflussen (61). Bei Krebspatienten besteht zudem häufig eine periphere Insulinresistenz (74), sodass sich hohe Blutzuckerwerte und Insulinspiegel gegenseitig verstärken (73).

Speziell in Bezug auf Brustkrebs ist zudem von Interesse, dass Insulin die Konzentrationen des ebenfalls proliferationsfördernden Hormons Östrogen steigern kann (75, 76). Vermittelt wird dies vermutlich über eine insulinbedingt verminderte Verfügbarkeit des Sexualhormon-Bindenden-Globulins (SBHG) (77, 78), sodass mehr freies Östrogen vorliegt (79). Auch eine gonadotrope Signalwirkung des Insulins selbst wird diskutiert (75).

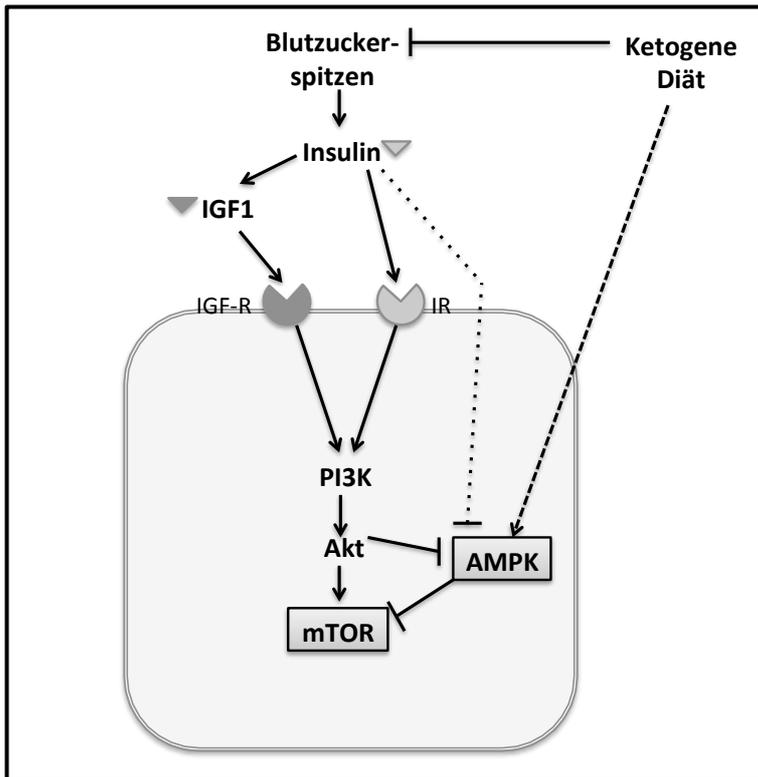


Abbildung 3: Onkogenkaskade PI3-Akt-mTOR.

Durch Blutzuckerspitzen kommt es zur reflektorischen Insulinsekretion, was die Erhöhung von IGF1 zur Folge hat. IGF1 und Insulin binden an die entsprechenden Rezeptoren (IGF-R) und aktivieren so die Signalkaskade PI3-Akt-mTOR. Durch diese Aktivierung werden Prozesse wie Tumorprogression, Metastasierung und Angiogenese begünstigt (29, 68). Bei fehlender Insulin-/IGF1- Wirkung, z. B. durch Kohlenhydratrestriktion oder ketogene Diät, fällt die Inhibition von AMPK durch Akt weg (69, 70). Diese indirekte Hemmung der AMPK durch Insulin ist durch eine gestrichelte Linie veranschaulicht. Meynet und Ricci (71) postulieren in ihrem Review selbige Effekte durch Kalorienrestriktion. Jiang et al. (72) konnten eine Aktivierung der AMPK durch Kalorienrestriktion zeigen.

IGF1: Insulin-like Growth Faktor 1, IGF-R: IGF-Rezeptor/ Insulinrezeptor, AMPK: Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase, PI3: Phosphoinositidkinase 3, Akt: Serin/Threonin-Kinase, mTOR: Mammilian Target of Rapamycin.

Abbildung modifiziert nach (73).

### **1.3.3 Hypoxie**

Ein weiteres Charakteristikum vieler Tumore stellt die hypoxische Sauerstofflage innerhalb des Gewebes dar (80, 81). Entgegen den Erwartungen, Tumorgewebe würde bei Sauerstoffmangel wie gesundes Gewebe mit einer verminderten Proliferation reagieren, lässt sich in karzinomatösen Zellen oft sogar noch ein vermehrtes Wachstum unter Hypoxie feststellen (82). Dies gelingt ebenfalls durch eine Steigerung der Glykolyse: bei Hypoxie wird der „Hypoxie-induzierte Faktor-1“ (HIF1- $\alpha$ ) stabilisiert, was seinerseits neben einer vermehrten Glukoseaufnahme in die Zelle eine erhöhte Expression glykolytischer Enzyme (33, 83) und eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung bewirkt (84, 85). Einen weiteren Vorteil bringt die Hypoxie für maligne Zellen hinsichtlich einer Radiotherapie: Im hypoxischen Zustand zeigt sich eine vermehrte Resistenz gegenüber Schäden durch ionisierende Strahlen (86). Schon in der frühen Kanzerogenese bedingen sich Proliferation und Sauerstoffunterversorgung gegenseitig, denn durch schnelles und massives Wachstum verlängern sich die Diffusionswege zwischen prämaligmem Tumorgewebe und versorgendem Blutgefäß. Randständige epitheliale Zellen werden bei noch intakter Basalmembran vom oxygenierten Blut dementsprechend schlecht erreicht und es kommt wiederholt zu Hypoxiezuständen. Dadurch werden schließlich diejenigen Zellen selektiert, die auch bei Sauerstoffmangel überleben können (48, 81, 87-89). Die veränderten O<sub>2</sub>-Bedingungen innerhalb von Tumorgeweben sind dementsprechend nicht zu vernachlässigen, weshalb bei den Versuchen dieser Arbeit stets auch die hypoxische Situation simuliert wurde. Im Hinblick auf die multipel veränderten Stoffwechselforgänge in Krebszellen wird nachvollziehbar, warum Seyfried et al. (83) Krebs als Erkrankung des Energiestoffwechsels beschreiben. Genau an dieser Stelle könne nach therapeutischen Ansätzen gesucht werden (44).

### **1.4 Ketogene Diät**

Der veränderte Glukosemetabolismus in Tumorzellen, der auf den ersten Blick wie ein Geniestreich der malignen Zellen erscheint, ist immer mehr zum

Angriffspunkt neuer Therapien geworden und könnte sich möglicherweise sogar als Achillesferse entpuppen. Da der gesamte Stoffwechsel von Krebszellen eine hohe Abhängigkeit von Glukose aufweist, stellt eine Limitation des Glukoseangebots, beispielsweise im Sinne von Fasten, einen wichtigen therapeutischen Ansatz dar. Bei Nahrungskarenz laufen zudem zahlreiche ineinandergreifende Vorgänge im menschlichen Körper ab, die keineswegs ein reines „Aushungern“ des Tumors bewirken, sondern weitaus mehr Effekte auf die Krebszellen haben. Zum einen kommt es durch Vermeidung von Schwankungen der Serumglukose und entsprechender Reduktion von Insulinspitzen zu verminderter Aktivierung von wachstumsfördernden Signalwegen und Onkogenkaskaden (71). Zum anderen werden als wesentliches Element des Fastenzustands Ketonkörper gebildet, die als alternative Energiequellen für gesunde Zellen fungieren und auch selbst Einfluss auf verschiedene Signalwege nehmen (90, 91). Auch der bei fehlender Glykolyse reduzierte Schutz der Tumorzellen vor reaktiven Sauerstoffmetaboliten sei an dieser Stelle erwähnt (s.o.).

Klinisch umgesetzt werden kann dieser Therapieansatz durch eine ketogene Diät, die durch eine starke Kohlenhydratrestriktion bei gleichzeitig gesteigerter Fettzufuhr gekennzeichnet ist. Dabei sollen mindestens 80% der aufgenommenen Energie aus Fetten (92) und maximal 10% aus Kohlenhydraten (93) stammen, bzw. soll das Verhältnis von Fetten zu Nicht-Fetten 2:1 bis 4:1 betragen (94-97). Durch diese Nahrungszusammensetzung können Blutzucker- bzw. Insulinspitzen vermieden werden (29, 68, 98-101), was die Imitation der Stoffwechsellage während des Fastens ermöglicht (73, 102-104). Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass der Blutzuckerspiegel durch ketogene Diät in der Regel nicht drastisch gesenkt wird. Vielmehr können Schwankungen vermieden und stabile Werte im Bereich des physiologischen Nüchternblutzuckerspiegels (ca. 60-90 mmol/l) erreicht werden (53, 98, 103-105). Ein reines "Aushungern" durch Glukoseentzug kann dementsprechend keine Rationale für das Fasten oder die ketogene Diät sein. Gleichzeitig bleibt bei der ketogenen Diät die energetische Versorgung der Patienten über die hochkalorischen Fette und die neu gebildeten Ketonkörper gesichert.

## 1.5 Ketonkörper und der Fastenstoffwechsel

Wie oben angedeutet, spielen Ketonkörper eine tragende Rolle im Fastenstoffwechsel sowie in der ketogenen Diät. Physiologisch werden dabei drei verschiedene Ketonkörper gebildet: Betahydroxybutyrat, Acetoacetat und Aceton. Letzteres ist energetisch instabil, toxisch und wird über die Atemluft abgegeben. 3-OHB und Acetoacetat können über die Betahydroxybutyrat-Dehydrogenase (BDH) ineinander umgewandelt werden und stellen die hauptsächlichen Energieträger dar. Mit einem Mengenverhältnis von 1:1 bis zu 3:1 im Vergleich zu Acetoacetat überwiegt prozentual jedoch das 3-OHB (100, 106).

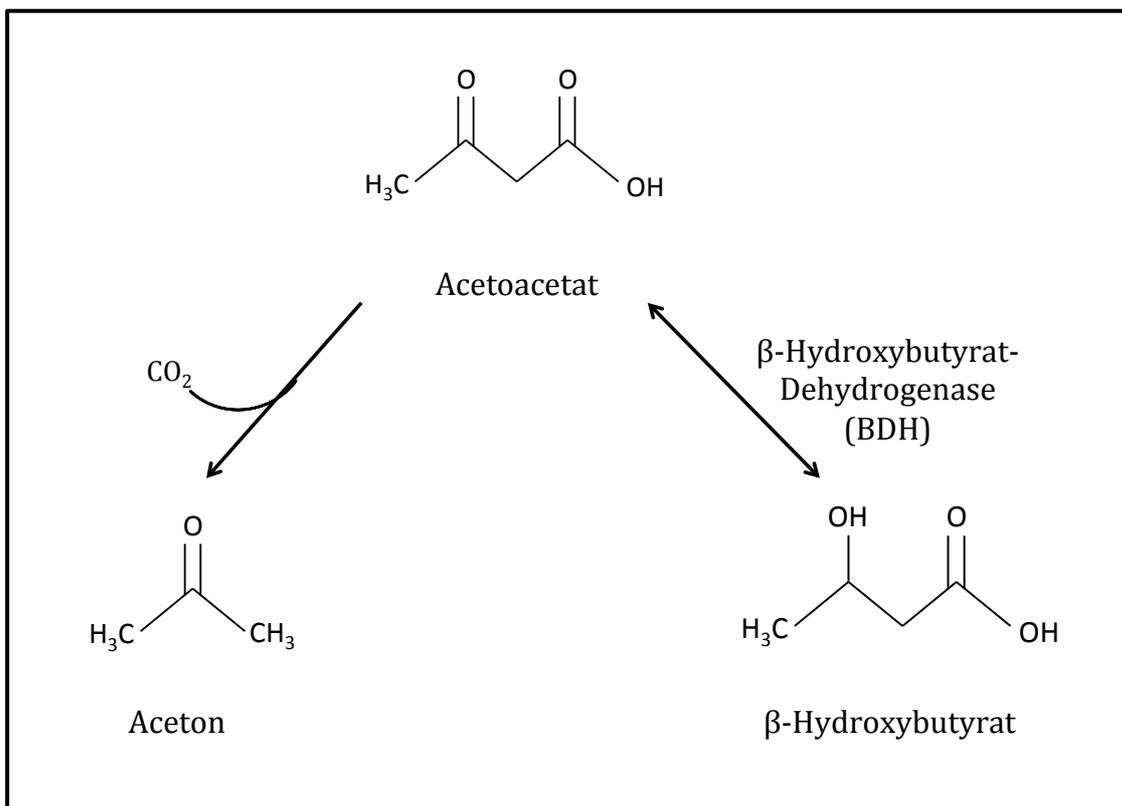


Abbildung 4: Ketonkörper.

Acetoacetat kann durch langsame, spontane Decarboxylierung in Aceton umgewandelt werden, oder durch die Betahydroxybutyrat-Dehydrogenase (BDH) zu Betahydroxybutyrat oxidiert werden. Auch die reverse Reduktion zu Acetoacetat wird über die BDH vermittelt (23, S.268).

Während im nüchternen Zustand die Ketonkörperspiegel im Serum bei etwa 0,1 bis 0,2 mM liegen, können beim Fasten physiologisch Konzentrationen von 2 bis 6 mM erreicht werden (53, 107). Abzugrenzen ist dieser Zustand von der diabetischen Ketoazidose, die eine gefährliche Stoffwechsellage im Rahmen des Diabetes Mellitus darstellt. Neben Ketonkörpern in weitaus höheren Konzentrationen (> 25 mM) liegt dabei ein deutlich erniedrigter pH-Wert vor (108). Gleichzeitig ist eine Ketoazidose durch stark erhöhte Blutzuckerwerte gekennzeichnet, während bei einer physiologischen Ketose Nüchternblutzuckerspiegel vorliegen. Wird beim Fasten die Glukosezufuhr reduziert, so hat dies zunächst eine verminderte Insulin- bei gleichzeitig erhöhter Glukagonsekretion zur Folge. Dadurch kommt es zu vermehrter Glykogenolyse und Glukoneogenese in den Hepatozyten, sodass der Glukosebedarf vorerst gedeckt werden kann. Hält die Nahrungskarenz jedoch über einen längeren Zeitraum an, sinkt der Insulinspiegel weiter. Die lipolytische Aktivität in Fettzellen wird gesteigert und die freiwerdenden langkettigen Fettsäuren werden mittels Betaoxidation zu Acetyl-CoA gespalten. Dieses im Überschuss vorliegende Acetyl-CoA kann im Zitratzyklus nur in geringem Maße oxidiert werden, da der Kreislauf durch einen Mangel an Oxalacetat bei verringertem Glukoseabbau nahezu zum Erliegen kommt. Stattdessen dient das Acetyl-CoA nun in den Mitochondrien der Hepatozyten als Substrat zur Ketonkörperbildung im Lynenzyklus. Neben den Leberzellen sind auch einige weitere Zellarten wie Astrozyten, Darmepithelzellen, und Nebennierenzellen zur Ketonkörperproduktion fähig. Die Ketonkörper werden anschließend ins Blut abgegeben und gelangen zu den extrahepatischen Zielorganen wie Gehirn, Herz und Muskel. Für die Aufnahme in die Zielzellen werden Transporter aus der MCT-Familie benötigt und 3-OHB muss zur weiteren Verwendung mittels der Betahydroxybutyrat-Dehydrogenase in Acetoacetat umgewandelt werden. In den Zielzellen angekommen werden die Ketone durch die Schlüsselenzyme  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Transferase (SCOT) und Acetoacetyl-CoA-Thiolase (ACAT) wieder zu Acetyl-CoA umgewandelt und schließlich zur Energiegewinnung in den Zitratzyklus eingeschleust. (23, S. 267-68, 466-73, 109). Abbildung 5 zeigt eine Übersicht über den Ketonkörperstoffwechsel.

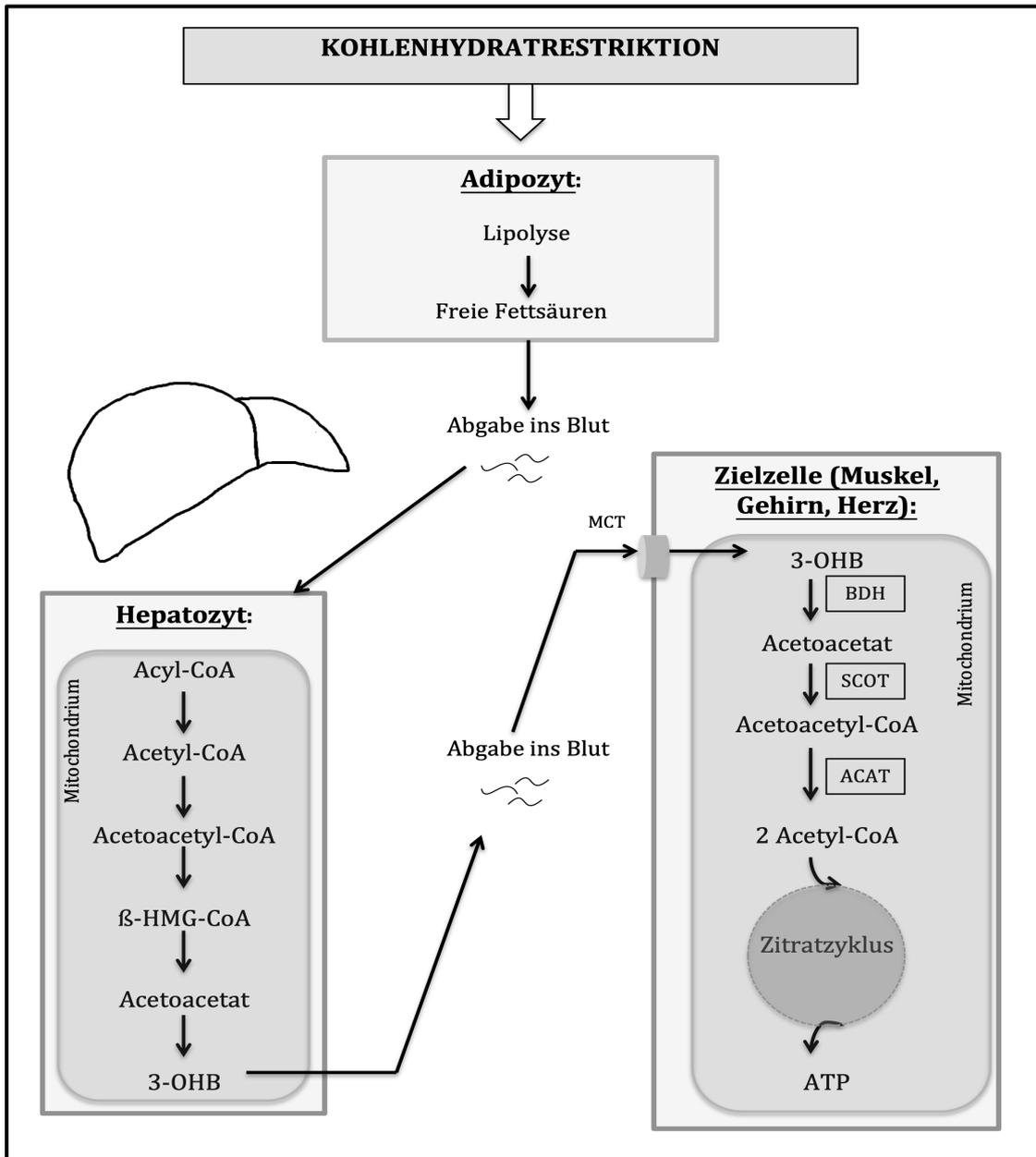


Abbildung 5: Ketonkörperstoffwechsel bei ketogener Diät bzw. Fasten.

Durch Kohlenhydratrestriktion kommt es zu vermehrter Lipolyse und Freisetzung freier Fettsäuren. Daraus werden in den Mitochondrien der Hepatozyten Ketonkörper synthetisiert, welche über den Blutweg zu den Zielzellen gelangen. Zur energetischen Verwertung der Ketonkörper sind die Enzyme BDH und SCOT essentiell. MCT: Monokarboxylsäure-Transporter, BDH: Betahydroxybutyrat-Dehydrogenase, SCOT:  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Transferase, ACAT: Acetoacetyl-CoA-Thiolase,  $\beta$ -HMG-CoA:  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-Coenzym A, ATP: Adenosintriphosphat. Abbildung orientiert an (23, 90, 91).

Der physiologische Mechanismus der Ketonkörperbildung ermöglicht also eine kontinuierliche Betaoxidation und stellt die Energieversorgung der Organe sicher. Pro verbrauchte Sauerstoffeinheit fungieren Ketonkörper sogar als effizientere Energiequelle als Glukose (110, 111), wobei die Nutzung dieser Energie an das Vorhandensein von Sauerstoff (112) sowie von ketolytischen Enzymen geknüpft ist. Dies stellt einen limitierenden Faktor für viele Krebszellen dar (113, 114). Neben energetischen Vorteilen besitzt 3-OHB aber auch regulatorisches Potential in zahlreichen Signalwegen. So kann 3-OHB an die G-Proteingekoppelten Rezeptoren GPR 109A (HCAR2) und GPR41 (FFAR3) binden und dadurch Einfluss auf den Energiestoffwechsel nehmen (90, 115, 116). Auch ein antientzündlicher Effekt konnte bereits auf 3-OHB zurückgeführt werden. Dieser kommt einerseits über die Aktivierung antiinflammatorischer (HCAR2-) Rezeptoren auf Makrophagen zustande (117), andererseits durch die Hemmung des NLRP3-Inflammasoms (118). Außerdem konnte gezeigt werden, dass 3-OHB die Spiegel proinflammatorischer Enzyme und Zytokine moduliert (119). Ein solcher Eingriff in das Immunsystem könnte gerade im Zusammenhang mit malignen Entartungen von Bedeutung sein.

Über die Fähigkeit, NADP<sup>+</sup> zu reduzieren und Coenzym Q zu oxidieren, welches andernfalls zur Entstehung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> führt (120), sowie über die Hemmung von Histondeacetylasen (121) kann 3-OHB zudem gesunde Zellen vor freien Radikalen schützen. Dies könnte gerade in Kombination mit einer Radio- oder Chemotherapie einen Vorteil für gesunde Zellen darstellen, während in Tumorzellen eine Verstärkung oxidativen Stresses und somit ein synergistischer Effekt zu erwarten wären (92). Eine zusätzliche Hemmung der Signalkaskade um mTOR ist zwar vermutlich nicht durch 3-OHB per se zu begründen, doch findet man auch sie unter ketogener Diät und Kalorienrestriktion (71). Abbildung 6 gibt einen Überblick über das regulatorische Potential von Ketonkörpern und ketogener Diät.

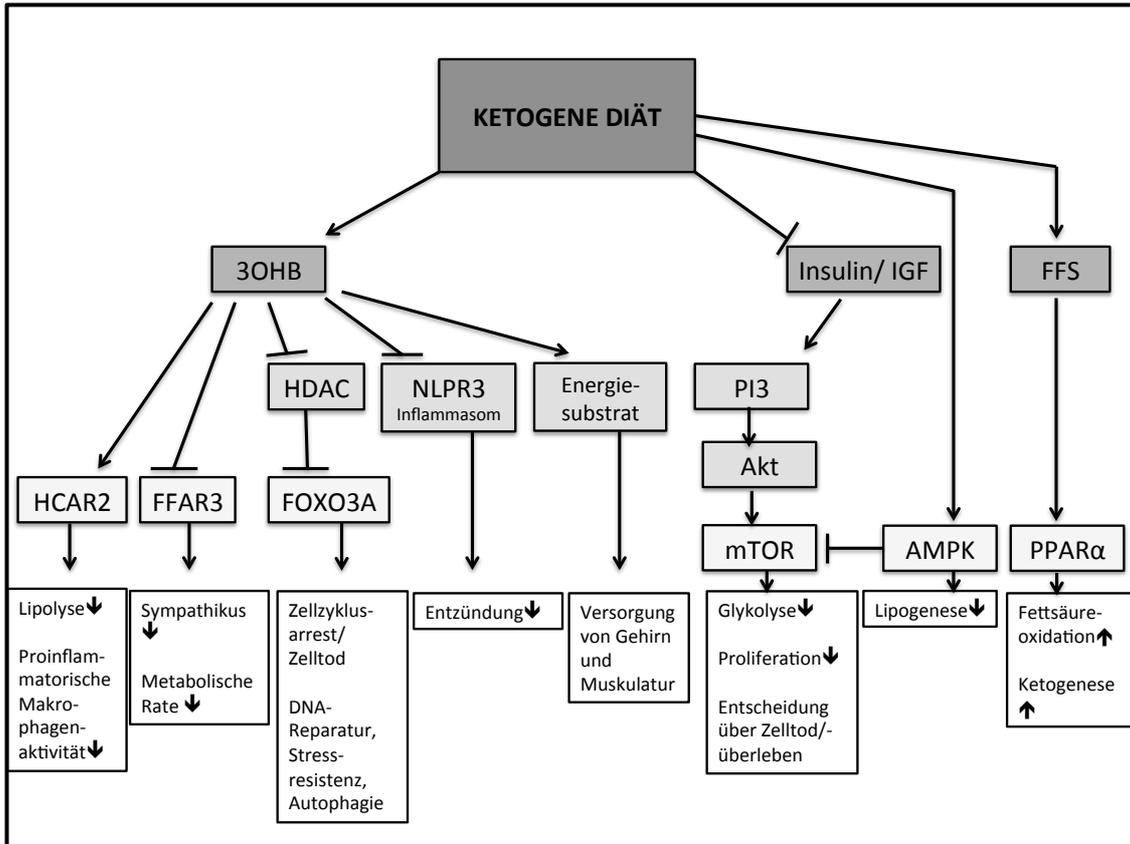


Abbildung 6: Regulatorisches Potenzial der ketogenen Diät.

Am Ende der Kaskaden sind jeweils die aus ketogener Diät resultierenden Effekte dargestellt. Pfeile innerhalb der Reaktionskette symbolisieren eine Aktivierung bzw. Stimulierung.

GPR: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, HCAR2: Hydroxycarboxylsäure-Rezeptor 2, FFAR3: Freie Fettsäuren-Rezeptor 3, HDAC: Histondeacetylasen, FOXO3A: Forkhead-Box-Protein 3, IGF: Insulin-like Growth Factor, PI3: Phosphoinositid-Kinase 3, Akt: Proteinkinase B, mTOR: Mammilian target of Rapamycin, FFS: Freie Fettsäuren, PPAR $\alpha$ : Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\alpha$ , AMPK: AMP-abhängige Kinase. Abbildung orientiert an (90, 91).

## 1.6 Fragestellung

Aus den oben angeführten Gründen rückt ein möglicher Einsatz von 3-OHB bzw. einer ketogenen Diät in der Krebstherapie aktuell vermehrt in den Fokus der Forschung. Zahlreiche In Vitro-Versuche sowie In Vivo-Studien bei Mensch und Tier erbrachten diesbezüglich kontroverse Ergebnisse, wenn auch ein Trend hinsichtlich einer Anti-Tumor-Wirkung von Ketonkörpern erkennbar erscheint (122). Gerade in Bezug auf Brustkrebs fehlt es allerdings noch an elementarer Forschung zum Einfluss von 3-OHB auf das Tumorwachstum, auch wenn viele Patientinnen und Patienten einer ketogenen Diät oder dem sogenannten Intermittierenden Fasten interessiert gegenüberstehen. Um eine solche Diät oder Fasten aber als adjuvante Therapie empfehlen zu können, müssen negative Auswirkungen oder gar ein Wirkungsverlust von Radio- und Chemotherapie durch Ketonkörper ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit soll nun der Effekt von 3-OHB auf das Wachstum von Brustkrebszellen in vitro im kurz- und langfristigen Kontext untersucht werden und das Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie bei gleichzeitiger Behandlung mit Ketonkörpern evaluiert werden. Abschließend sollen erwünschte sowie unerwünschte Wirkungen einer ketogenen Diät beleuchtet werden, um im Zusammenhang mit den experimentellen Ergebnissen die Sicherheit einer solchen diätischen Intervention in der Klinik zu beurteilen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien

Es wurden Mammakarzinomzellen der Linien BT474, MCF-7 und T47D verwendet. Sämtliche Zelllinien waren humanen Ursprungs und wurden vom Hersteller Cell Line Service bezogen.

#### 2.1.2 Chemikalien

Dulbecco's Modified Eagle Medium No Glucose (DMEM)	Gibco Thermo Scientific Heidelberg
1:1 Mischung Dulbecco's MEM/Ham's F-12 (DMEM/Ham's F12)	Biochrom Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom Berlin
Gentamicin 10 mg/ml	Biochrom Berlin
Sodium-3-Hydroxybutyrat	Sigma-Aldrich
Glukose 40 %	Braun, Melsungen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom Berlin
Aquadest	Braun, Melsungen
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe

Kristallviolett	Sigma-Aldrich
Methanol	Sigma-Aldrich
Essigsäure Rotipuran	Carl Roth, Karlsruhe
<u>Kits</u>	
Cell Counting Kit 8	Sigma-Aldrich
BrdU Cell Proliferation Assay Kit	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

### 2.1.3 Medien

5 mM- Glukose-Medium (G5-Medium):	500 ml DMEM 500 µl Gentamicin 50 ml FCS 1250 µl Glukose 40 %
Zellkulturmedium:	500 ml DMEM/Ham's F12 500 µl Gentamicin 50 ml FCS
3-OHB-Lösung:	3-OHB G5-Medium Menge je nach gewünschter Molarität

Für alle Versuche wurden wiederholt 3-OHB-Lösungen verschiedener Molarität benötigt. Hierfür wurde pulverförmiges Betahydroxybutyrat auf einer Feinwaage abgewogen, in G5-Medium gelöst und steril über 0,2 µm- Filter filtriert.

#### 2.1.4 Zytostatika

Für die Durchführung der Chemosensitivitätstestungen wurden die Zytostatika Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin verwendet. Alle drei Reagenzien wurden als Stocklösungen von der hauseigenen Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg bereitgestellt.

#### 2.1.5 Verbrauchsmaterial

0,2 µm Filter Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen verschiedener Größen Biosphere® Filtertips	Sarstedt Nümbrecht
Sammelröhrchen 15ml und 50ml, CellStar® Polypropyrene Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 1,5 ml, Eppendorf Tubes® 3810X	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen 2 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
PCR-Röhrchen 8er Streifen Eppendorf PCR Tubes	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup> und 175cm <sup>2</sup> CellStar® Filter Top T75, T175	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Flachbodenplatten, 96, 48 und 6 Well

TPP Techno Plastic  
Products AG, Schweiz

Ketose Teststreifen  
FreeStyle Precision beta-Ketone

Abbot Diabetes Care Ld.,  
Witney, United Kingdom

### 2.1.6 Geräte

CO<sub>2</sub>- Inkubator

Labotect

Hypoxie-Inkubator,  
O<sub>2</sub> Control Glove Box

Toepffer Lab Systems

Tischmikroskop

Leica

Zählkammer „Neubauer Improved“

LaborOptik, Friedrichsdorf

Zentrifuge EBA 12 R (klein)

Hettich

Zentrifuge Universal 320 R (groß)

Hettich

Tecan GENios Plus ELISA Reader

Tecan, Schweiz

Zellkulturkamera,  
CTL Immuno Capture 6.2

Cellular Technology Ctd.

Linearbeschleuniger Primus

Siemens,Concord,  
CA, USA

BioPhotometer D30

Eppendorf, Hamburg

Wippe, Heidolph Duomax 1030

Heidolph

Wippe, Mini Rocker Shaker

Biosan

Glukosemessgerät, Accu Check Sensor

Roche

Ketosemessgerät, Precision Xceed	MediSense, Abbot Diabetes Care
Vortexer	VWR International, Darmstadt
Pipettus, Accu-Jet	Brand, Wertheim
Pipetten, Multisteppipetten, Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg

### **2.1.7 Software**

Sämtliche Daten wurden mithilfe der Programme Microsoft Excel und GraphPad Prism 6 (Graphpad Software Incorporation) statistisch ausgewertet und graphisch veranschaulicht.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkulturmethoden**

#### Kulturelle Anzucht der Zelllinien

Für die Anzucht der Erhaltungskultur wurden Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> bzw. 175 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche verwendet. Die Zellen wurden als Suspension in die Flaschen gegeben, die anschließend je nach Größe mit etwa 15 ml bzw. 30 ml DMEM/Ham's F12 -Nährmedium aufgefüllt wurden. Die Lagerung erfolgte im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C und 21 % O<sub>2</sub>. Täglich wurden Zellwachstum und -vitalität am Mikroskop beurteilt sowie die Kulturen auf potenzielle Kontaminationen untersucht.

### Mediumwechsel

Da vitale Zellen einen Großteil der im Medium vorhandenen Nährstoffe nach 3 bis 4 Tagen aufbrauchen, musste jeweils zu diesem Zeitpunkt ein Mediumwechsel erfolgen. Dafür wurde das verbrauchte Medium gänzlich durch Absaugen entfernt und im Anschluss je nach Größe der Zellkulturflasche durch 15 ml bzw. 30 ml frisches Nährmedium ersetzt.

### Zellen splitten

Erreichte der Zellrasen eine Konfluenz von mehr als 80 %, so wurden die Zellen gesplittet. Hierfür wurde das Nährmedium abgenommen und die Flasche mit 15 ml PBS-Puffer gespült. Im Anschluss wurde 1 ml Trypsin-EDTA zugegeben, die Flasche vorsichtig einige Male geschwenkt und das Trypsin wieder vollständig entfernt. Danach wurde die Flasche für den Trypsinverdau 5 Minuten lang im Brutschrank bei 37°C und 21 % O<sub>2</sub> inkubiert, bis sich die Zellen durch mäßiges Klopfen vom Flaschenboden lösen ließen. Der Flaschenboden wurde gründlich mit neuem Nährmedium gespült und die Zellen darin aufgenommen. Um die einzelnen Zellen voneinander zu separieren, wurde die Suspension mehrmals gut durchmischt. Je nach gewünschter Zellzahl wurden die Zellen dann gezählt und ausgesät oder ein Teil des zellhaltigen Mediums in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit Nährmedium aufgefüllt.

### Zellzählung

Die Zählung der Zellen erfolgte mithilfe einer „Neubauer improved“-Zählkammer. Von der zu untersuchenden Zellsuspension wurden dafür 20 µl abgenommen, mit 20 µl Trypanblau vermischt und auf die Zählkammer gegeben. Im Anschluss wurden die Zellzahlen in jedem der vier Großquadranten mikroskopisch ermittelt und die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrant rechnerisch bestimmt. Diese wurde dann mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10<sup>4</sup> multipliziert, um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu erhalten.

## **2.2.2 Experimentelles Design**

### **2.2.2.1 Colony Forming Test**

Um das längerfristige Wachstums- und koloniebildende Verhalten der verschiedenen Zelllinien zu beurteilen, wurde der Colony Forming Test durchgeführt. Hierfür wurden pro Zelllinie drei 48-Well-Zellkulturplatten verwendet. Es wurden jeweils 12 mittig gelegene Wells mit Zellsuspension versetzt, während die randständigen Wells mit PBS-Puffer gefüllt wurden, um Artefakten durch Verdunstung vorzubeugen. In 6 Wells wurden je 150 Zellen pro Well in 500 µl G5-Medium ausgesät, in weiteren 6 Wells geschah Selbiges in 500 µl 3 mM 3-OHB-Lösung (s. Abbildung 7). Im Anschluss wurde je eine Platte bei 1 %, 5 % und 21 % Sauerstoffgehalt inkubiert und nach 7 Tagen ein Mediumwechsel mit der entsprechenden G5- bzw. 3-OHB-Lösung durchgeführt. Nach weiteren 7 Tagen wurden die entstandenen Kolonien mittels des Kristallviolett-Tests (s. 2.2.3.2.) gefärbt und luftgetrocknet. Hierfür wurden aufgrund der Well-Größe jeweils 200 µl Methanol sowie 100 µl Kristallviolett verwendet. Auf ein Lösen des Kristallvioletts mittels Essigsäure und eine anschließende photometrische Bestimmung der optischen Dichte wie für einen Kristallviolett-Test (siehe 2.2.3.2) wurde in diesem Fall verzichtet. Stattdessen wurde das Wachstumsverhalten der Kolonien fotografisch mit einer Zellkulturkamera dokumentiert.

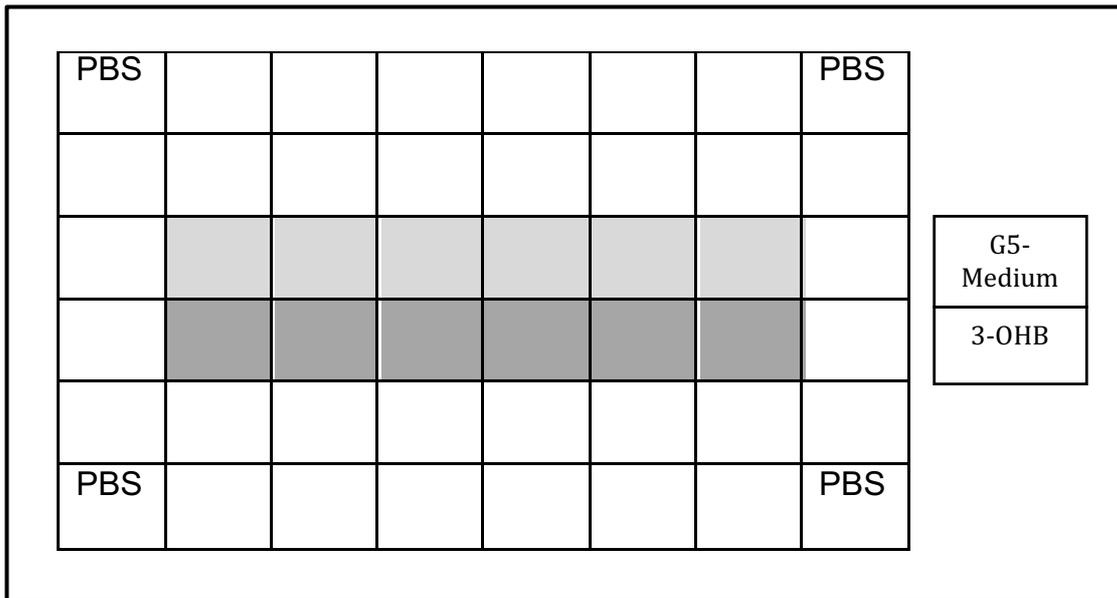


Abbildung 7: Plattenbelegung beim Colony Forming Assay.

Die 12 zentral gelegenen, farblich hinterlegten Wells wurden mit den zu untersuchenden Zellsuspensionen bestückt.

### 2.2.2.2 Methoden der Chemosensitivitätstestungen

Die Chemosensitivitätstestungen wurden in zwei Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Reihe wurde die Sensitivität gegenüber Epirubicin und Paclitaxel, in der zweiten Reihe die gegenüber Carboplatin untersucht.

Für die Testung der Chemosensitivität auf Paclitaxel und Epirubicin wurden pro Zelllinie drei 96-Well-Flachbodenplatten verwendet. Es wurde zunächst in einem Vorversuch die ideale Zellzahl pro Well ermittelt. Entsprechend dem Wachstumsverhalten der Zelllinien wurden dann 350 Zellen pro Well in 100 µl Zellsuspension ausgesät, wobei die Wells in der obersten Reihe zum Schutz vor Verdunstung und Randartefakten mit je 200 µl PBS-Puffer gefüllt wurden. Bei der Chemosensitivitätstestung auf Carboplatin wurden je zwei Zelllinien pro Platte ausgesät. Hier wurde auf den PBS- Rand verzichtet, um eine weitere Verdünnungsstufe zu ermöglichen. Stattdessen wurden die beiden Höchstkonzentrationen, die in Vorversuchen fast jegliches Zellwachstum verhindert hatten, am oberen und unteren Rand der Platten aufgetragen.

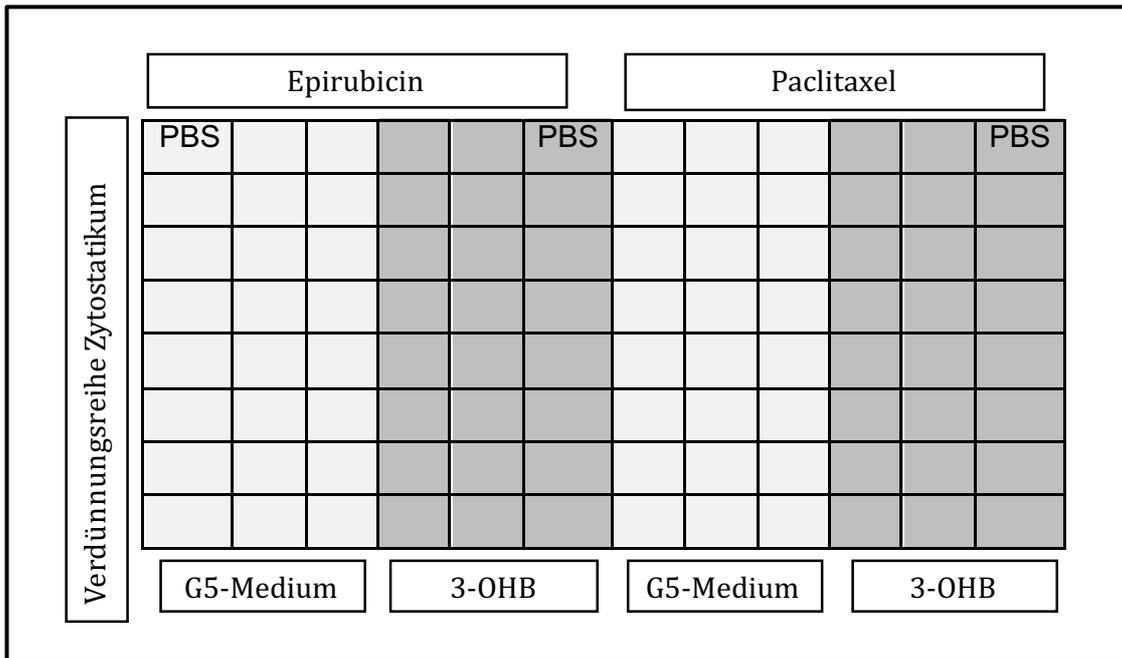


Abbildung 8: Plattenbelegung für je eine Zelllinie bei Chemosensitivitätstestungen gegenüber Epirubicin bzw. Paclitaxel.

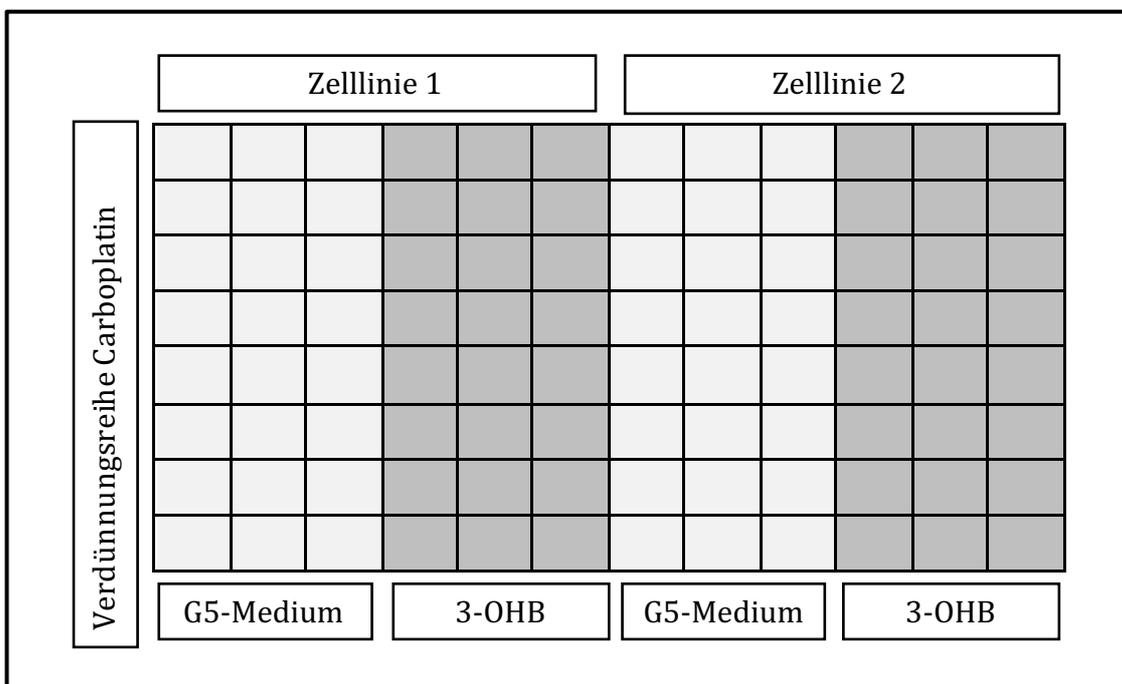


Abbildung 9: Plattenbelegung bei Chemosensitivitätstestungen gegenüber Carboplatin.

Nach Aussaat der Zellen wurden alle Platten pro Versuchsansatz vier Stunden lang bei 21 % Umgebungssauerstoff inkubiert, damit eine gleichmäßige Adhärenz gewährleistet war. Danach wurde je eine Platte in die 1 % O<sub>2</sub>- bzw. 5 % O<sub>2</sub>-Hypoxiebank verlagert. Die dritte Platte verblieb bei 21 % O<sub>2</sub> im Wärmeschrank.

Nun wurde allen Zellen eine Anwuchsphase von 72 Stunden bei 37°C gewährt, bis ihnen am 4. Versuchstag je 100 µl des Epirubicin-, Paclitaxel- bzw. Carboplatin-haltigen Kulturmediums pro Well zugesetzt wurden. Hierfür wurden Konzentrationen gewählt, die sich nach den maximal erreichbaren Plasmaspiegeln aus aktueller Literatur richteten (114, 123, 124). Als maximale Plasmakonzentrationen (=100 % TDI, Test Drug Concentration) wurden für Epirubicin 0,5 µg/ml (123, 125), für Paclitaxel 13,6 µg/ml (114, 123, 124) und für Carboplatin 15,8 µg/ml (123) angenommen. Nachdem die Zellen in einem Vorversuch mit jeweils 200 %, 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % und 6,25 % der TDI behandelt worden waren, mussten die Konzentrationen jedoch an die jeweilige Potenz der Zytostatika in der von der Apotheke gelieferten Qualität angepasst werden. Für Epirubicin wurden nun 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,56 %, 0,78 % und 0 % der TDI verwendet, für Paclitaxel 50 %, 5 %, 0,5 %, 0,05 %, 0,005 %, 0,0005 % und 0 % der TDI und für Carboplatin 400 %, 200 %, 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 % und 0 % der TDI. Es wurden standardmäßig zwei verschiedene Verdünnungsreihen hergestellt, die erste basierend auf einem reinen G5-Medium, die zweite basierend auf einer in G5-Medium angesetzten 6 mM 3-OHB-Lösung, sodass letztlich im Well eine 3-OHB-Konzentration von 3 mM erreicht wurde. Die Platten wurden dafür jeweils in der Mitte geteilt, sodass pro Zytostatikum und pro Konzentration je 6 Wells zur Verfügung standen. Drei davon wurden nun mit zytostatikumhaltigem G5-Medium versetzt, die anderen drei mit der entsprechenden 3-OHB-haltigen Zytostatikalösung. Die Zytostatikazugabe erfolgte unter den anfangs festgelegten O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 1 %, 5 %, bzw. 21 %. Im Anschluss daran wurden die Zellen weitere 96 Stunden bei 37°C inkubiert, bis am 7. Versuchstag zur Beurteilung der Zellvitalität der BrdU-Test durchgeführt wurde (s. 2.2.3.3.).

Zur statistischen Auswertung wurde die optische Dichte jener Wells, in denen die Zellen in G5-Medium wuchsen, derer der jeweils entsprechenden Wells mit Betahydroxybutyrat-Zugabe gegenübergestellt. Wie in Punkt 2.2.3.3. beschrieben, steht die optische Dichte nach Durchführung des BrdU-Tests in direkter Relation zur Menge vitaler Zellen pro Well. Das Mittel der völlig unbehandelten Kontrollwells (ohne Zytostatikazugabe) in G5-Medium wurde für jede Zelllinie und jede Versuchsplatte individuell gleich 100 % gesetzt und als Referenzwert verwendet. Dementsprechend wurden nun je 2 Kurven erstellt, die den prozentualen Anteil vitaler Zellen und somit das Absterben bei Zytostatikazugabe in G5 bzw. 3-OHB-Medium gegenüber nativen Zellen abbilden. Auf der X-Achse wurde jeweils die anteilige Zahl lebendiger Zellen aufgetragen, während auf der Y-Achse die prozentualen Zytostatikakonzentrationen abgebildet wurden. Zudem wurde die mittlere Hemmkonzentration, die IC 50, berechnet. Dies ist jene Zytostatikakonzentration, bei der noch 50 % der Zellen überleben. Um die IC 50 in einer Dosis-Wirkungskurve graphisch zu veranschaulichen, wurde zunächst eine Dosisreihe mit den faktischen Zytostatikakonzentrationen erstellt. Die einzelnen Werte ergaben sich dabei jeweils aus dem Produkt des prozentualen TDI-Anteils und der maximalen Plasmakonzentration, welche 100 % der TDI entspricht. Anschließend wurde der Logarithmus eines jeden Wertes der Dosisreihe gebildet und auf der X-Achse gegenüber der prozentualen Zellzahl auf der Y-Achse aufgetragen.

### **2.2.2.3 Ketonkörpernachweis bei Chemosensitivitätstestungen**

Derselbe Versuchsansatz wurde verwendet, um den Verbrauch von 3-OHB durch die Zellen zu bestimmen. Jeweils am 7. Versuchstag wurde vor Durchführung des BrdU-Tests das Medium der Negativkontrollen abgenommen, in eine neue 96-Well-Platte überführt und bei -20°C eingefroren. Es handelte sich hierbei um jene 12 Wells, denen kein Zytostatikum zugesetzt worden war. Am Ende der Versuchsreihe wurden diese Platten wieder aufgetaut und die zusammengehörigen Wells in einem Sammelröhrchen gepoolt. Für die Versuche

mit Epirubicin und Paclitaxel ergaben sich dabei je 6 Wells mit G5-Medium und 6 Wells mit 3-OHB-Lösung pro Platte. Bei den Carboplatin-Versuchen hingegen, wo zwei verschiedene Zelllinien auf eine Platte aufgetragen worden waren, wurden dementsprechend nur drei äquivalente Wells pro Platte gepoolt. Mittels Ketose-Teststreifen und einem zugehörigen Messgerät wurde nun die durchschnittliche 3-OHB-Konzentration bestimmt. Zur Ermittlung des Ketonkörperverbrauchs wurde jeweils die Differenz der gemessenen Werte zu den im Versuch anfänglich angesetzten 3 mM 3-OHB pro Well berechnet. Diese wurde für jede Sauerstoffkondition in einem Säulendiagramm graphisch veranschaulicht.

#### **2.2.2.4 Glukose- und Laktatmessung**

Zur Messung der Glukosekonzentration im Wachstumsvergleich wurde ähnlich vorgegangen wie bei der Ketosemessung. Auch hier wurden die Wells nach oben genanntem Schema gepoolt, anschließend aber zur Messung an das Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg übergeben. Während die gemessenen Laktatverwerte direkt der Laktatproduktion entsprachen, musste der Glukoseverbrauch erst rechnerisch ermittelt werden. Dafür wurde jeweils der gemessene Glukosewert von jener Glukosekonzentration abgezogen, die zu Beginn des Experiments in allen Wells erzeugt worden war (95 mg/dl). Sowohl Laktatproduktion als auch Glukoseverbrauch wurden in Säulendiagrammen graphisch dargestellt.

#### **2.2.2.5 Wachstumsvergleich 3-OHB / G5-Medium**

Ebenso wurde der Versuchsansatz der Chemosensitivitätstestungen verwendet, um das kurzfristige Wachstum der nativen Zellen nach 7 Tagen in G5-Medium und 3 mM 3-OHB-Nährlösung miteinander zu vergleichen. Hierfür wurden jeweils die Ergebnisse jener Wells herangezogen, denen kein Zytostatikum zugegeben worden war. Für die Gesamtauswertung konnten für jede Zelllinie jeweils die Ergebnisse aller drei Zytostatikaversuche verwendet und miteinander verrechnet

werden. Das Mittel der Kontrollwerte in G5-Medium wurde als Referenzwert bestimmt und die gemessenen Werte der Zellen in 3-OHB-Lösung dazu in Relation gesetzt.

#### **2.2.2.6 Methoden der Radiosensitivitätstestung**

Für die Testung der Radiosensitivität wurden die drei zu untersuchenden Zelllinien in einer 96-Well-Flachbodenplatte ausgesät. Um einen effizienten Verdunstungsschutz zu gewährleisten, wurden mehrere Wellreihen der Platte mit PBS-Puffer gefüllt. Es wurden 150 Zellen pro Well in 100 µl Zellsuspension verwendet und pro O<sub>2</sub>-Kondition 5 Platten damit bestückt. Anschließend wurden jeweils auf einer Hälfte der Platte 100 µl G5-Medium als Kontrolle, bzw. 100 µl 6 mM 3-OHB-Lösung (Endkonzentration 3 mM) auf der anderen Hälfte hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 1 %, 5 %, bzw. 21 % O<sub>2</sub> und 37°C wurden die Platten mit Dosen von 0, 2, 4, 6 und 8 Gray durch einen 6 MV Linearbeschleuniger der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Würzburg bestrahlt. Die Kontrollplatte (0 Gray) wurde wie die anderen Platten behandelt und lediglich nicht bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen zurück an den Inkubationsort mit der jeweiligen Sauerstoffkonzentration gebracht. Dort wurde am 8. Versuchstag ein Mediumwechsel mit 100 µl frischem G5-Medium bzw. 3 mM 3-OHB-Lösung durchgeführt. Schließlich wurde am 14. Versuchstag die Zellvitalität mittels des WST-8-Tests (s. 2.2.3.1.) untersucht. Im Anschluss wurde zudem ein Kristallviolett-Test durchgeführt (s. 2.2.3.2.) Da die Versuchsreihe zweimalig bei gleichem Design durchgeführt wurde, konnten die Ergebnisse der beiden Durchläufe gemeinsam betrachtet und verrechnet werden. Die graphische Veranschaulichung beider Tests erfolgte wie auch bei den Chemosensitivitätstestungen: der Mittelwert der optischen Dichte der nativen Kontrollzellen in G5-Medium wurde als Referenzwert verwendet und die übrigen Werte daran anteilig errechnet. Entsprechende Graphen wurden nach Vorbild der Chemotoxizitätsversuche erstellt.

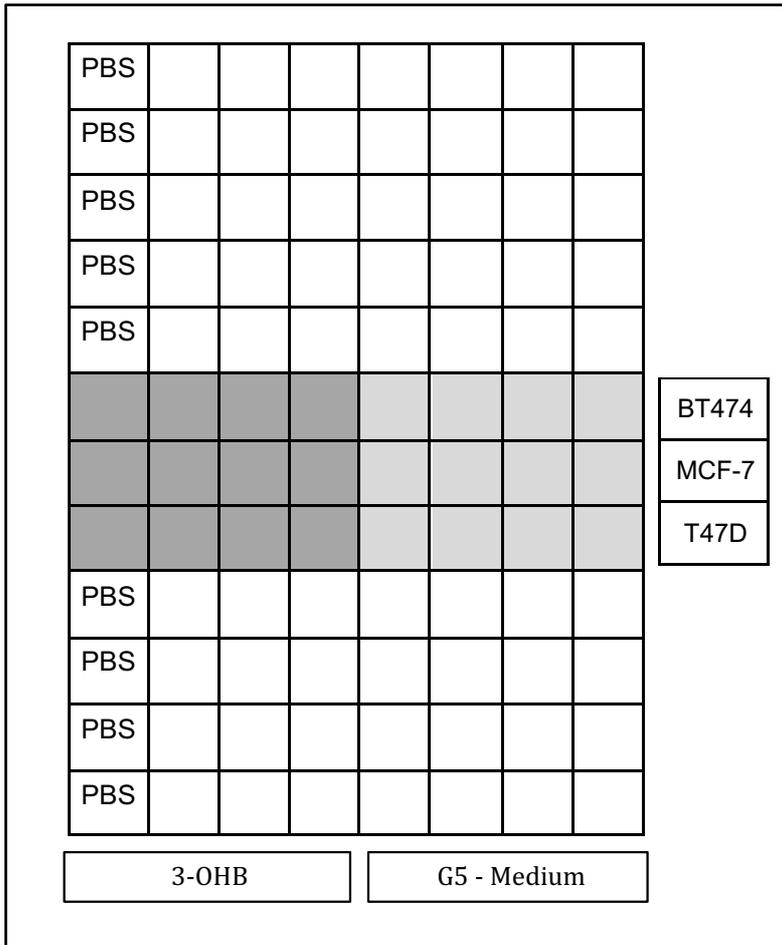


Abbildung 10: Plattenbelegung für je eine Sauerstoffkondition und Bestrahlungsintensität bei Radiosensitivitätstestungen.

### 2.2.3 Methoden der Quantifizierung vitaler Zellen

#### 2.2.3.1 WST-8-Test

Der WST-8-Test wurde zur Ermittlung der Anzahl vitaler Zellen nach Radio- und Chemosensitivitätstestungen eingesetzt. Bei WST-8 handelt es sich um ein hydrophiles Tetrazolium-Salz [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt ], welches in lebenden Zellen durch Dehydrogenasen reduziert wird. Das dabei entstehende Formazan sorgt für eine Gelbfärbung der Zellsuspension, was sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifizieren lässt. Die Absorptionsrate bei 450 nm ist

direkt proportional zur Dehydrogenasen-Aktivität und somit auch zur Anzahl lebender Zellen. Für die Durchführung wurde das „Cell Counting Kit 8“ von Sigma Aldrich verwendet. Es wurden je 15 µl WST-8 pro Well hinzugegeben und die Absorptionsrate jeweils nach einer, zwei und drei Stunden photometrisch bestimmt.

### **2.2.3.2 Kristallviolett-Test**

Auch der Kristallviolett-Test eignet sich zur Quantifizierung der Zellzahl nach Radio- bzw. Chemotoxizitätsversuchen. Allerdings ist dieser Test nur in der Lage, adhärente Zellen nachzuweisen, da sämtliche Zellen im Überstand durch Waschvorgänge abgeschwemmt werden. Für die Durchführung wurde der Überstand zunächst durch Abklopfen entfernt und es wurden 100 µl bzw. 200 µl Methanol pro Well hinzugegeben. Die Menge richtete sich hierbei nach der Wellzahl pro Platte und somit nach der jeweiligen Wellgröße. Bei 96-Well-Platten wurden 100 µl verwendet, bei 48-Well-Platten die doppelte Menge. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Platten erneut abgeklopft und je nach Wellgröße 50 µl bzw. 100 µl Kristallviolett pro Well hinzugefügt. Nach einer wiederholten Inkubationszeit von 10 Minuten wurden die Platten mehrmals mit destilliertem Wasser übergossen, gewaschen und anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Am folgenden Tag wurden 200 µl Essigsäure pro Well hinzugegeben und die Absorptionsrate nach einer 30-minütigen Inkubationszeit unter kontinuierlichem Schwenken bei 670 nm bestimmt.

### **2.2.3.3 BrdU-Test**

Der BrdU-Tests eignet sich zur Beurteilung der Zellproliferation bei Chemosensitivitätstestungen. Bei BrdU handelt es sich um 5-Bromo-2'-Desoxyuridin, ein halogeniertes Nukleotid und Pyrimidin-Analogon, das anstelle von Thymidin in die zelluläre DNA eingebaut werden kann. Wird BrdU zu den zu

testenden Zellen gegeben, so kommt es während der folgenden Zellteilungen zum Einbau in die DNA der Tochterzellen. Danach kann über einen murinen anti-BrdU- Antikörper und anschließend einen sekundären, Meerrettichperoxidase (HRP) -markierten Antikörper die eingebaute BrdU-Menge bestimmt werden. Hierbei wandelt das Enzym HRP das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) um, was zu einem Farbumschlag führt. Dieser kann im Anschluss photometrisch quantifiziert werden und lässt aufgrund der direkten Proportionalität zur eingebauten BrdU-Menge eine direkte Aussage über die Zahl der Zellteilungen und somit über die Proliferationsaktivität zu. Für die Durchführung wurde das „BrdU Cell Proliferation Assay Kit“ von Cell Signaling Technology verwendet. Das BrdU wurde 1:100 in G5-Medium verdünnt und im Anschluss wurden je 20 µl der Lösung in jedes Well gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden pro Well je 50 µl der „Fixing/Denaturing Solution“ hinzugefügt und die Zellplatten weitere 30 Minuten inkubiert. Danach wurde der Überstand durch Abklopfen entfernt und der murine, primäre Antikörper („BrdU Detection Antibody 100 x“) 1:100 in „Detection Antibody Diluent“ gelöst. Davon wurden 50 µl pro Well hinzugegeben und die Platten für eine weitere Stunde Inkubationszeit luftdicht verschlossen. Nach wiederholtem Entfernen des Überstands wurden die einzelnen Wells dreimal mit je 200 µl Waschpuffer („20 x Wash buffer“) gereinigt. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper, der „Anti-mouse-IgG-HRP-linked antibody“, 1:100 im entsprechenden „Anti-mouse-IgG-HRP-linked antibody diluent“ verdünnt und es wurden je 50 µl der Lösung in jedes Well gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten und ein erneutes dreimaliges Waschen mittels 200 µl Waschpuffer. Anschließend wurden jedem Well 50 µl TMB Substrat zugesetzt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Substrats wurden die Zellplatten an einem lichtgeschützten Ort bei Raumtemperatur je nach Stärke der Farbentwicklung weitere 5 bis 30 Minuten inkubiert. Sobald ein ausreichend kräftiges Farbsignal zu erkennen war, wurde die Reaktion mittels jeweils 50 µl der „STOP Solution“ unterbunden. Zuletzt wurde die Farbentwicklung und somit die optische Dichte photometrisch bei 450 nm gemessen.

## 2.2.4 Auswertung und Statistik

Sämtliche Daten wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism 6 statistisch ausgewertet und graphisch veranschaulicht. Signifikanzen wurden mittels des nichtparametrischen Kruskal-Wallis Tests bzw. des Mann-Whitney-U Tests berechnet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Wachstumsvergleich 3-OHB / G5-Medium

Um einen möglichen Einfluss von 3-OHB auf das Wachstum der zu untersuchenden Tumorzellen in Abhängigkeit von der Oxygenierung zu analysieren, wurden die Zellen für 7 Tage bei drei verschiedenen Sauerstoffbedingungen in reinem G5-Medium bzw. in G5-Medium mit 3 mM 3-OHB kultiviert. In Abbildung 11 ist das Wachstumsverhalten der untersuchten Tumorzelllinien in G5-Medium im Vergleich zu 3 mM 3-OHB-Medium dargestellt. Die Wachstumsrate wurde auf den Mittelwert der gemessenen optischen Dichte der Kontrollzellen (in G5-Medium) bezogen. Auf diese Art zeigen die Zellen in G5-Medium ein relatives Wachstum von ca. 100 %. Die Schwankungen repräsentieren die Versuchs- zu Versuchsabweichung und sprechen mit Werten von unter 5 % für die hohe Reproduzierbarkeit der angesetzten Einzelversuche.

Die Zellen der Linie **BT474** erreichten im Standardnährmedium im Mittel Werte von  $100 \pm 3,3$  (1 % O<sub>2</sub>),  $100 \pm 3,7$  (5 % O<sub>2</sub>) und  $100 \pm 3,4$  Prozent (21 % O<sub>2</sub>). Dem gegenüber stehen die Werte der Zellen in 3 mM 3-OHB-Lösung von  $96,4 \pm 3,8$  (1 % O<sub>2</sub>),  $91,1 \pm 2,8$  (5 % O<sub>2</sub>) und  $93,2 \pm 4,5$  Prozent (21 % O<sub>2</sub>), welche jeweils ein leicht reduziertes Wachstum der Zellen unter 3-OHB in allen drei Sauerstoffkonzentrationen anzeigen. Diese Wachstumsunterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Bei der Zelllinie **MCF-7** wiesen die Kontrollwerte in G5-Medium Standardfehler von 1,5 (1 % O<sub>2</sub>), 2,3 (5 % O<sub>2</sub>) und 2,1 (21 % O<sub>2</sub>) auf. Die mit 3-OHB behandelten Zellen zeigten keinen einheitlichen Trend, sondern bei 1 % Sauerstoff ein unverändertes Wachstum mit  $100,7 \pm 0,8$ , ein leicht gesteigertes Wachstum bei 5 % Sauerstoff mit  $104,5 \pm 2,1$  und ein leicht reduziertes Wachstum unter 21 % Sauerstoff mit  $96,1 \pm 4,9$  Prozent Wachstum im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Die Zelllinie **T47D** zeigte tendenziell in 3-OHB-Lösung unter allen drei Sauerstoffbedingungen ein leicht reduziertes Wachstum von  $98,1 \pm 3,0$  (1 % O<sub>2</sub>),  $97,9 \pm 5,3$  (5 % O<sub>2</sub>) und  $90,8 \pm 3,6$  Prozent (21 % O<sub>2</sub>) im Vergleich zu den Kontrollen in G5-Medium.

Es konnte jedoch in keinem Fall ein signifikanter Unterschied zwischen dem Zellwachstum der Kontrollen und dem in 3-OHB-Lösung festgestellt werden, sodass weder die Zugabe von 3-OHB noch die Hypoxie einen merklichen Einfluss auf das Zellwachstum hatte.

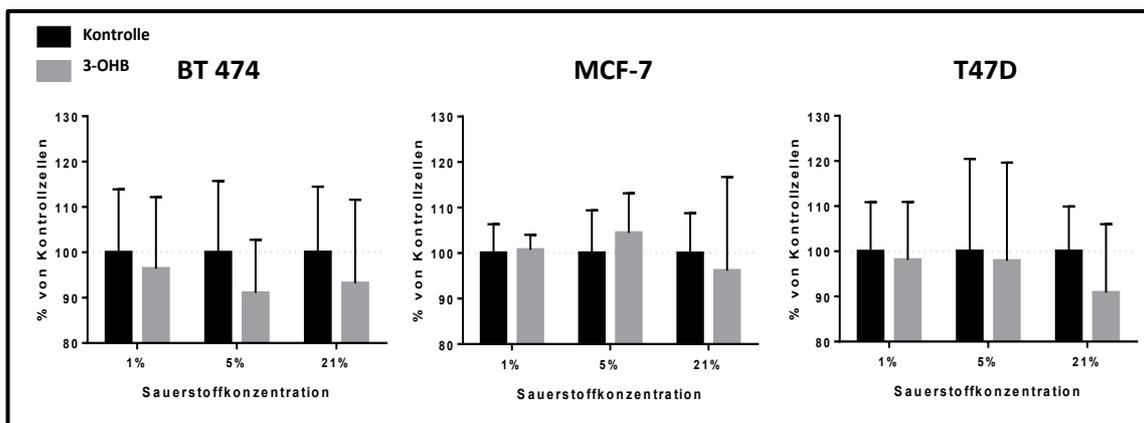


Abbildung 11: Wachstumsverhalten der untersuchten Tumorzelllinien in G5-Medium (Kontrolle) im Vergleich zu ihrem Wachstum in 3 mM 3-OHB bei 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff.

Nachdem sich in der Kurzzeitkultur nur ein dezenter Trend zum verlangsamten Zellwachstum unter 3-OHB abzeichnete, ergab sich die Frage, ob eine längere Kultur unter 3-OHB einen deutlicheren Effekt aufzeigen würde. Im Colony Forming Assay konnte das Wachstumsverhalten der Zelllinien über 14 Tage hinweg beurteilt werden. Abbildung 12 zeigt die entsprechenden Ergebnisse. Art

und Größe der Koloniebildung sowie das Wachstum der Kolonien variierten von Zelllinie zu Zelllinie. Jedoch wurde das jeweilige Verhalten durch Kultivierung in 3-OHB-haltigem Medium in Gegenüberstellung zu G5-Medium kaum beeinflusst. Die Konfluenz der Kolonien erschwerte die zahlenmäßige Erfassung einzelner Kolonien, sodass keine absolute Aussage über die Koloniezahl getroffen werden kann. Dennoch lässt sich für BT474 und MCF-7 tendenziell ein Wachstumsvorteil bei höheren O<sub>2</sub>-Konzentrationen verzeichnen. T47D dagegen zeigte unabhängig vom Sauerstoffangebot ein gleichmäßiges Wachstum.

Somit zeigte sich auch in Langzeitkultur weder ein wachstumshemmender noch wachstumssteigernder Effekt von 3-OHB auf das Proliferationsverhalten der getesteten Zellen.

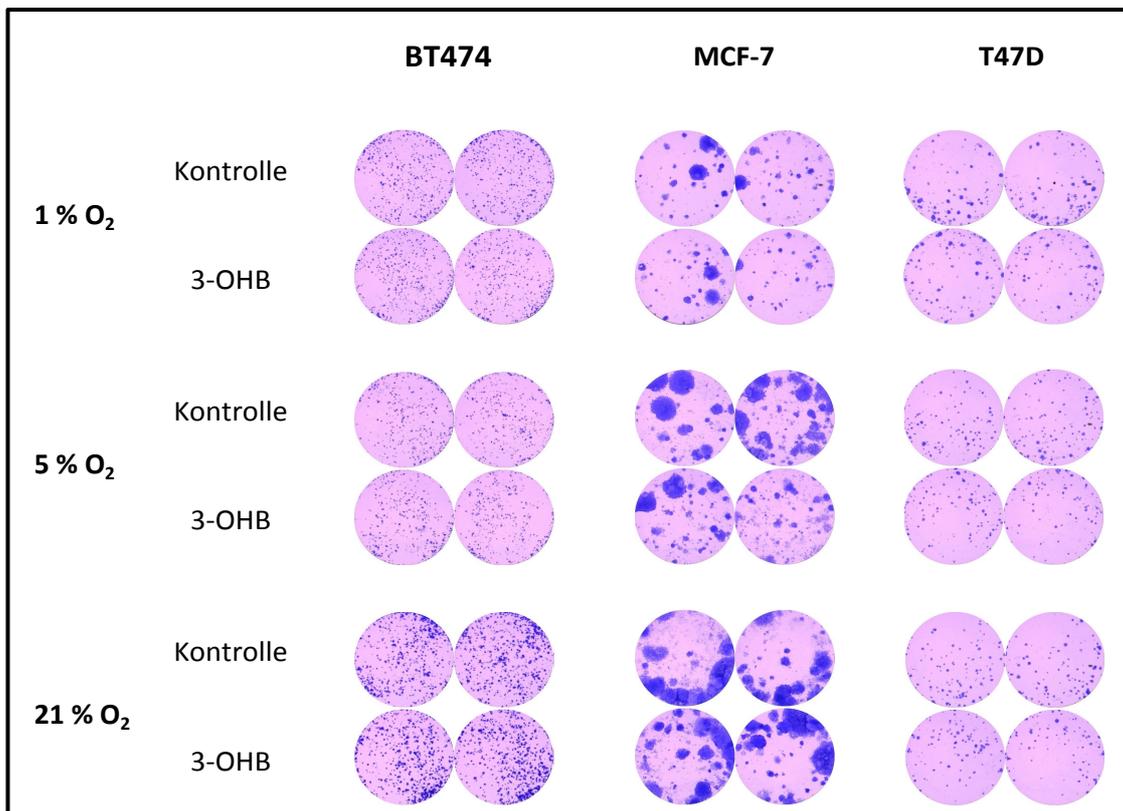


Abbildung 12: Wachstumsmuster beim Colony Forming Assay.

Pro Zelllinie sind je 4 exemplarische Wachstumsmuster dargestellt. Dabei sind die in G5-Medium gezüchteten Kontrollen den mit 3-OHB behandelten Zellen bei jeweils 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff gegenübergestellt.

### 3.2 Glukoseverbrauch und Laktatbildung

Glukoseverbrauch und Laktatbildung von Tumorzellen können als Maß für deren Stoffwechselltyp herangezogen werden. Abbildung 13 zeigt die durchschnittliche Laktatproduktion sowie den Glukoseverbrauch der entsprechenden Zelllinie nach einer Versuchsdauer von 7 Tagen. Zusätzlich wurden in Abbildung 13 die absoluten, gemittelten Glukosekonzentrationen und deren Standardfehler veranschaulicht. Jede der drei untersuchten Zelllinien produzierte messbares Laktat, wobei die Laktatmenge innerhalb einer Zellfamilie unabhängig vom Sauerstoffangebot relativ stabil blieb und damit deutlich den „Warburg-Effekt“ aufzeigt. Auch zwischen den mit 3-OHB behandelten Zellen und den jeweiligen Kontrollen war kein deutlicher Unterschied in der Laktatproduktion zu verzeichnen. Der Glukoseverbrauch dagegen variierte stärker mit dem O<sub>2</sub>-Angebot und auch die zugegebenen Ketonkörper schienen sich etwas mehr darauf auszuwirken. Jedoch war dabei kein einschlägiges Muster zu erkennen.

**BT474** produzierte am wenigsten Laktat im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien; die gemessenen Werte blieben bei allen drei Sauerstoffbedingungen im Mittel stets unter 2 mmol/l. Auch Kontrollen und Experimentalzellen unterschieden sich in der Laktatabgabe nur um maximal 0,1 mmol/l. Der Glukoseverbrauch war bei BT474 mit bis zu 10,8 mg/dl bei 1 % O<sub>2</sub> am deutlichsten ausgeprägt, während bei 21 % O<sub>2</sub> durchschnittlich weniger als 5 mg/dl verbraucht wurden. Die Zellen in 3-OHB-Lösung konsumierten im Schnitt bei 1 % etwas weniger Glukose (-8,3 mg/dl) als die Kontrollen (-10,8 mg/dl), bei 5 % hingegen verbrauchten sie durchschnittlich 0,8 mg/dl mehr als die Zellen im Kontrollmedium. Bei 21 % O<sub>2</sub> wiederum hielt sich der Glukosekonsum in den beiden Ansätzen mit jeweils 3,8 mg/dl die Waage.

Bei **MCF-7** fielen Laktatproduktion und Glukoseverbrauch im Vergleich zu T47D und BT474 am höchsten aus. Mit durchschnittlich 3,4 mmol/l (1 % O<sub>2</sub>), 3,5 mmol/l (5 % O<sub>2</sub>) und 3,3 mmol/l (21 % O<sub>2</sub>) produzierten die Zellen in 3-OHB-Lösung stets weniger Laktat als die Kontrollzellen (3,5 mmol/l bei 1 % O<sub>2</sub>, 3,6 mmol/l bei 5 % O<sub>2</sub> und 21 % O<sub>2</sub>). Ein besonders ausgeprägter Glukosekonsum war bei 21 % O<sub>2</sub>

zu verzeichnen, wo im Mittel Werte von -20,0 mg/dl (Kontrolle) und -19,0 mg/dl (3-OHB) erreicht wurden. Bei 5 % O<sub>2</sub> verwerteten die mit 3-OHB behandelten Zellen 1,0 mg/dl mehr Glukose als die Kontrollen, bei 1 % O<sub>2</sub> waren es im Schnitt nur 0,4 mg/dl mehr. Alle Unterschiede befinden sich dabei unterhalb des Signifikanzniveaus.

**T47D** war bezüglich der produzierten Laktatmenge zwischen BT474 und MCF-7 einzuordnen und zeigte unabhängig vom Sauerstoffangebot ein recht heterogenes Bild. Die Unterschiede zwischen Experimentalzellen und Kontrollen fielen mit Werten von maximal 0,1 mmol/l (5 % O<sub>2</sub>) eher gering aus. Der Glukoseverbrauch war mit -11,9 mg/dl (Kontrolle) und -11,6 mg/dl (3-OHB) bei 21 % O<sub>2</sub> am höchsten, während bei 5 % O<sub>2</sub> Werte von -10,5 (Kontrolle) und - 12,5 mg/dl (3-OHB) erreicht wurden. Am wenigsten Glukose konsumierten die Zellen bei 1 % O<sub>2</sub>: 7,5 mg/dl waren es im Kontrollmedium und 10,8 mg/dl in 3-OHB-Lösung.

In Zusammenschau der Messergebnisse zeigt sich bei keiner der Zelllinien ein bedeutsam veränderter Glukosestoffwechsel bei Inkubation mit 3-OHB.

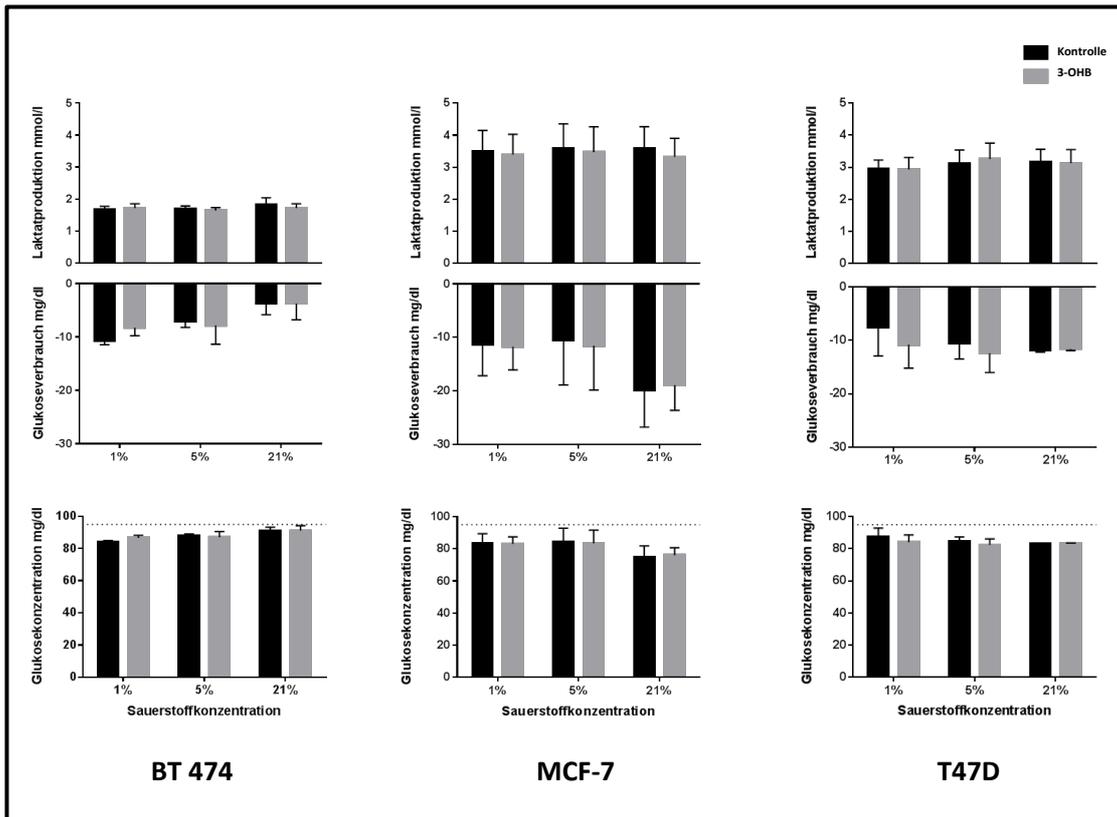


Abbildung 13: Durchschnittliche Laktatproduktion sowie Glukoseverbrauch der jeweiligen Zelllinien nach einer Versuchsdauer von 7 Tagen bei jeweils 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff.

### 3.3 Konzentration und Verbrauch von 3-OHB

Auch der Metabolismus von 3-OHB selbst durch die Zellen und die daraus resultierenden 3-OHB-Konzentrationen wurden untersucht. In Abbildung 14 sind die entsprechenden 3-OHB-Konzentrationen sowie der rechnerisch ermittelte Verbrauch des Betahydroxybutyrats am Ende der Versuche dargestellt.

Die Zellen der Linie **BT474** brauchten verglichen mit den anderen beiden Zelllinien am meisten 3-OHB auf. Bei Versuchsende hatte sich die 3-OHB-Konzentration bei allen drei Sauerstoffbedingungen von initial 3 mmol/l auf gemittelt 1,8 mmol/l reduziert.

**MCF-7** dagegen verstoffwechselte die zugegebenen Ketonkörper nur sehr spärlich. Bei 21 % O<sub>2</sub> wurden durchschnittlich nur 0,18 mmol/l verbraucht, bei 1 % O<sub>2</sub> waren es gerade einmal 0,03 mmol/l. Bei 5 % O<sub>2</sub> wurde zudem ein leichter Anstieg auf 3,15 mmol/l gemessen, was am ehesten auf einen Messfehler oder ein leichtes Eindampfen des Zellkulturmediums zurückzuführen ist.

**T47D** ist mit durchschnittlichen 3-OHB-Endkonzentrationen von 2,55 (1 % O<sub>2</sub>) 2,68 (5 % O<sub>2</sub>) und 2,50 mmol/ (21 % O<sub>2</sub>) bezüglich des 3-OHB-Verbrauchs einmal mehr im Mittelfeld der drei Zelllinien anzuordnen.

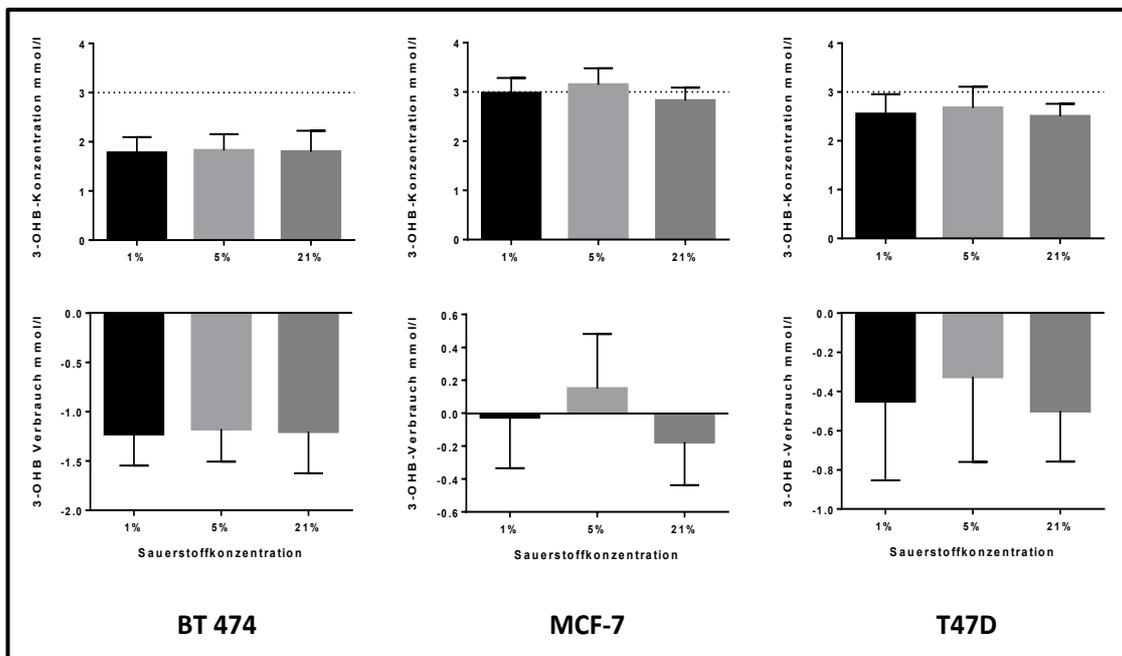


Abbildung 14: Konzentration und Verbrauch von Betahydroxybutyrat.

Für jede Zelllinie und Sauerstoffkondition sind die resultierenden 3-OHB-Konzentrationen sowie der rechnerisch ermittelte Verbrauch des Betahydroxybutyrats am Ende der Versuche dargestellt.

### 3.4 Radiosensitivitätstestungen

Eine elementare Fragestellung unserer Versuche war, ob bei ketogener Diät physiologische 3-OHB-Konzentrationen die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber einer Bestrahlung verändern. Die Ergebnisse der entsprechenden Bestrahlungsversuche zeigen die Abbildungen 15-17. Für jede Zelllinie wurden die Auswertungen aus Kristallviolett- und WST-8-Test einander gegenübergestellt. Zum größten Teil spiegeln sich die Ergebnisse im jeweils anderen Test wider, wenn auch der Kristallviolett-Test größere Standardabweichungen aufweist. Bei allen dreien der untersuchten Zelllinien überlagerten sich die Kontroll- und 3-OHB-Kurven stark und sind teilweise sogar fast identisch, sodass hier kein signifikanter Einfluss von 3-OHB beobachtet werden konnte. Bei allen drei Zelllinien zeigt sich zudem eine vermehrte Strahlenresistenz unter Hypoxie.

Das Wachstum der Zelllinie **BT474** wurde durch die Bestrahlung selbst bei der höchsten Dosis von 8 Gray nur mäßig beeinflusst. Weder im WST-8- noch im Kristallviolett-Test fiel die Zellzahl bei 5 % und 21 % O<sub>2</sub> unter 50 %, bei 1 % O<sub>2</sub> unterschritt sie sogar kaum 100 % (WST-8-Test). Dementsprechend konnte eine IC 50 Berechnung hier nicht durchgeführt werden. Die Ergebnisse Radiosensitivitätstestung bilden eine hohe Strahlenresistenz der Zelllinie BT474 ab.

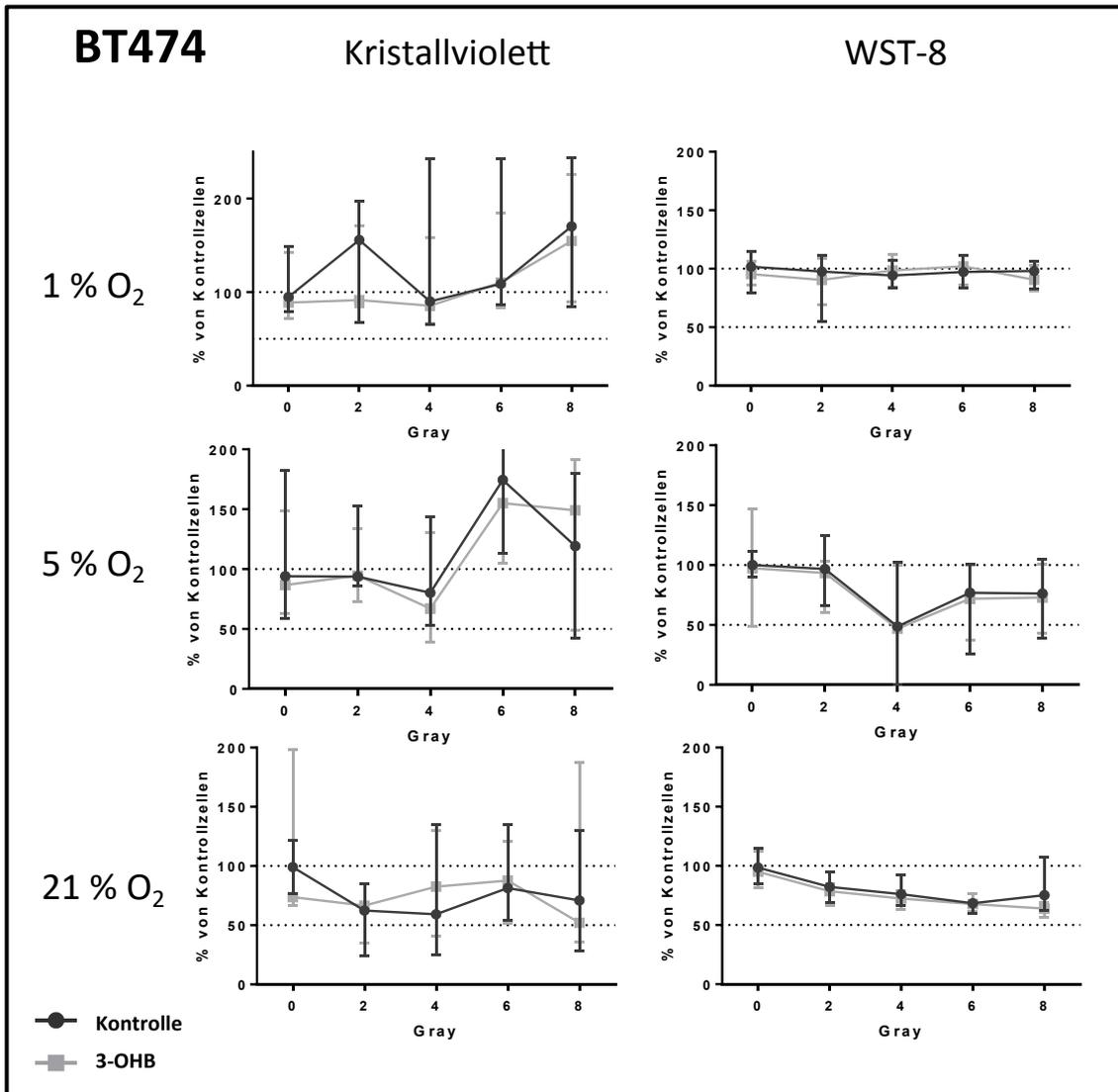


Abbildung 15: Veränderungen der Zellzahlen von BT474 nach Bestrahlung mit Dosen von 0, 2, 4, 6 und 8 Gray.

Die im G5-Medium wachsenden Kontrollen sind den mit 3-OHB behandelten Zellen bei jeweils 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff nach Durchführung des Kristallviolett- bzw. WST-8-Tests gegenübergestellt.

Die **MCF-7**-Zellen dagegen reagierten etwas sensibler auf die Bestrahlung. Während die Zellzahl bei 1 % O<sub>2</sub> bei den höheren Strahlendosen auf etwa 50 % und bei 21 % O<sub>2</sub> schon bei 2 Gray auf deutlich unter 50 % reduziert wurde, zeigten sich die Zellen bei 5 % O<sub>2</sub> auch nach einer Höchstdosis von 8 Gray weitestgehend strahlenresistent.

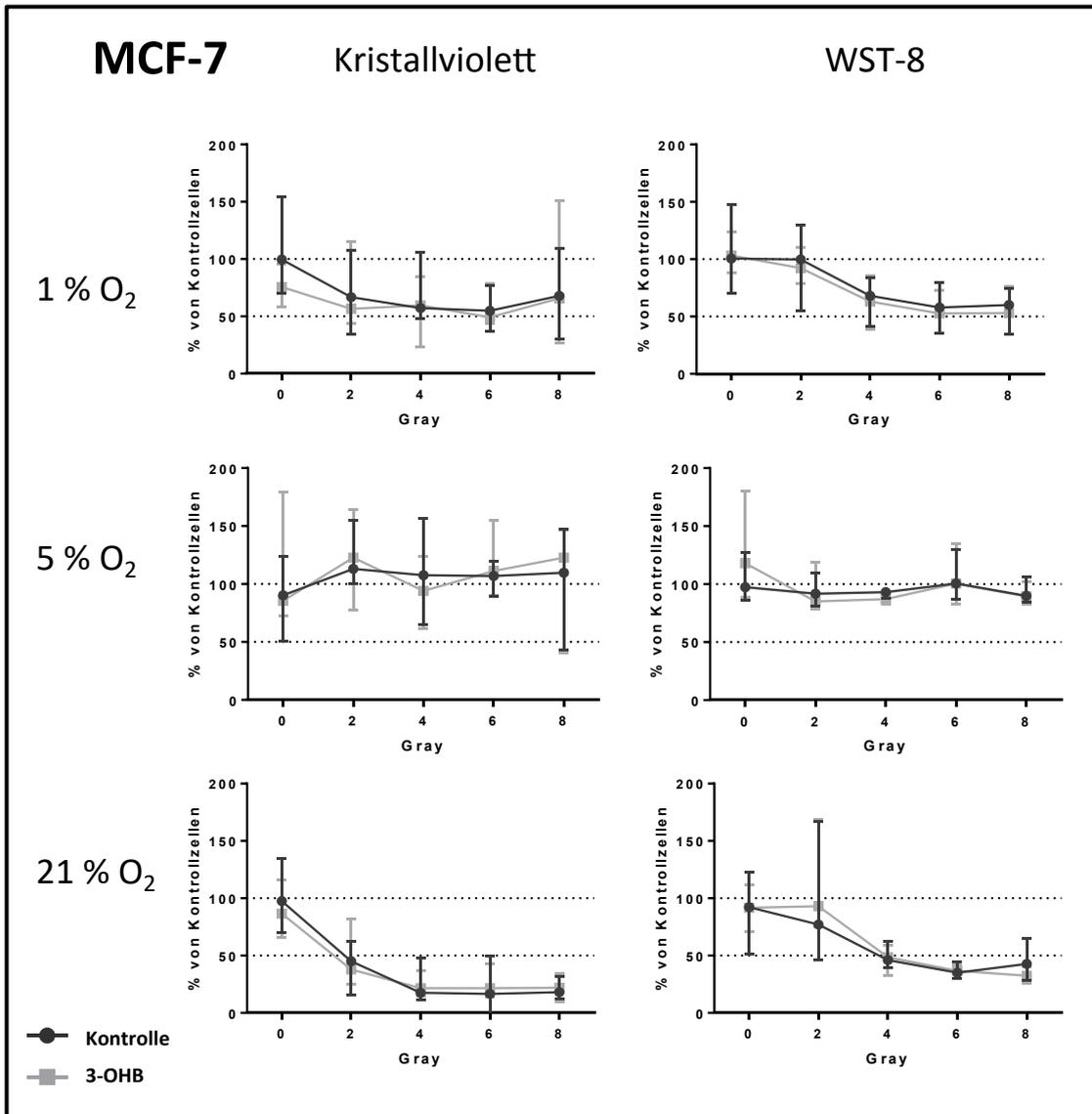


Abbildung 16: Veränderungen der Zellzahlen von MCF-7 nach Bestrahlung mit Dosen von 0, 2, 4, 6 und 8 Gray.

Die im G5-Medium wachsenden Kontrollen sind den mit 3-OHB behandelten Zellen bei jeweils 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff nach Durchführung des Kristallviolett- bzw. WST-8-Tests gegenübergestellt.

Für die Zelllinie **T47D** wiederum ließ sich lediglich bei 21 % O<sub>2</sub> eine deutliche Zellzahlreduktion verzeichnen. Hier blieben nach der Bestrahlung mit 8 Gray weniger als 50 % der Zellen vital. Im Gegensatz dazu blieb die Zellzahl bei 1% O<sub>2</sub> sowie bei 5 % O<sub>2</sub> nahezu gänzlich unverändert. Unter diesen Bedingungen scheinen T47D-Zellen extrem resistent gegenüber Bestrahlungen zu sein.

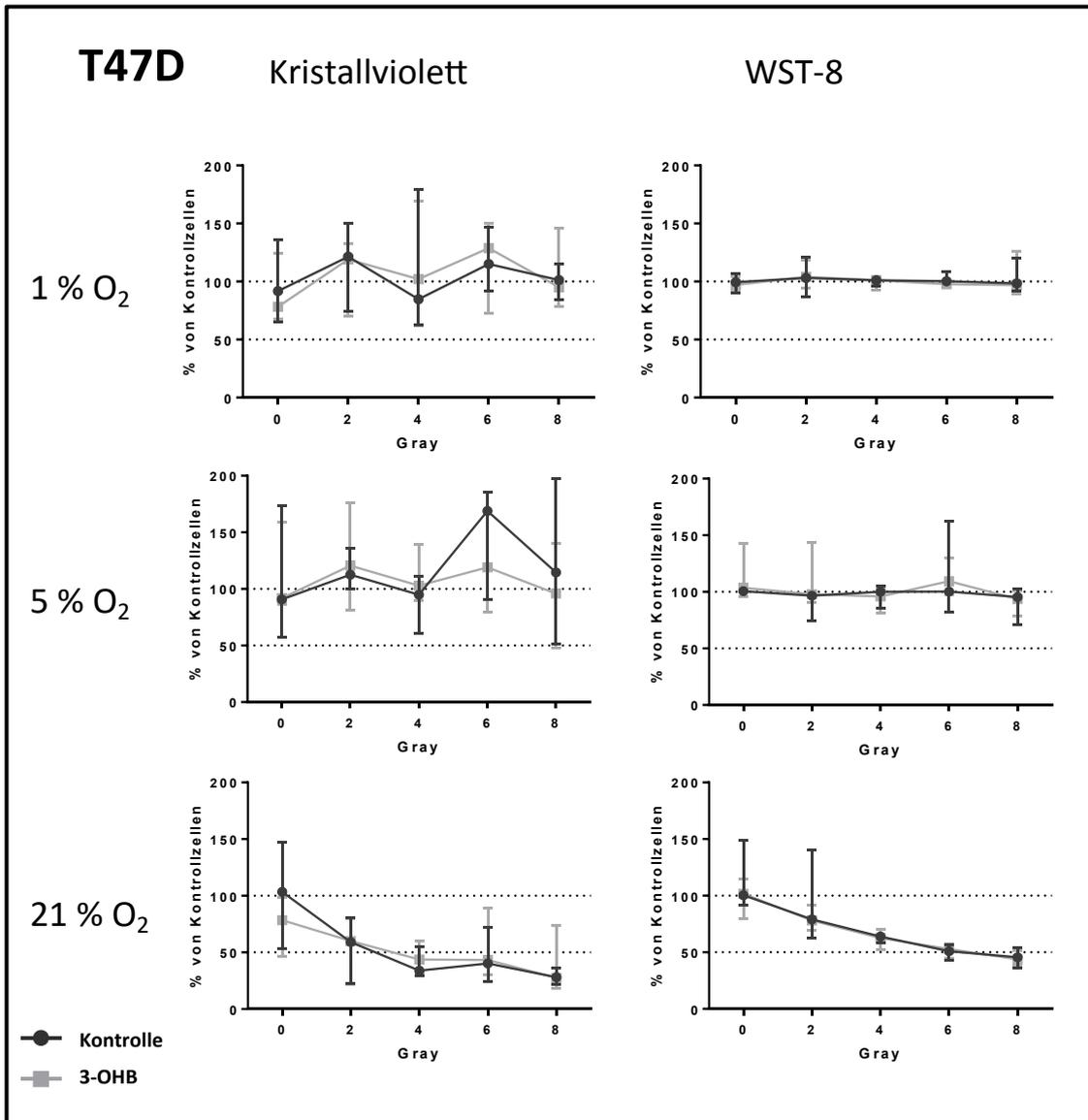


Abbildung 17: Veränderungen der Zellzahlen von T47D nach Bestrahlung mit Dosen von 0, 2, 4, 6 und 8 Gray.

Die im G5-Medium wachsenden Kontrollen sind den mit 3-OHB behandelten Zellen bei jeweils 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff nach Durchführung des Kristallviolett- bzw. WST-8-Tests gegenübergestellt.

Zusammenfassend lässt sich also weder bei Zellen der Linien BT474, MCF-7 noch T47D eine durch 3-OHB-Zugabe signifikant veränderte Radiosensitivität feststellen.

### 3.5 Chemosensitivitätstestungen

Um außerdem die Frage zu klären, ob die verwendeten Brustkrebszellen unter 3-OHB ihre Sensitivität gegenüber häufig eingesetzten Zytostatika ändern, wurden Chemosensitivitätstestungen durchgeführt, deren Ergebnisse in den Abbildungen 18-20 dargestellt sind. In der Mehrheit der Fälle ließ sich kein Unterschied zwischen dem Überleben der Zellen in Kontrollmedium und derer in mit 3-OHB versetztem Medium feststellen.

Bei der Zelllinie **BT474** wird dies besonders deutlich: die Medium- bzw. 3-OHB-Kurven überlagern sich hier unabhängig davon, welches der drei Zytostatika zugegeben worden war. In den Versuchsansätzen mit Carboplatin sind die beiden Kurven zu allen drei Sauerstoffbedingungen jeweils sogar nahezu deckungsgleich. Auffällig ist hier zudem die hohe Resistenz gegenüber Carboplatin, wie sie häufig auch für Mammakarzinome im klinischen Kontext beschrieben wird. Bei 5 % O<sub>2</sub> reduziert sich das Zellwachstum erst bei einer Konzentration von über 100 % der TDI um die Hälfte, bei 21 % und 1 % O<sub>2</sub> ist dies sogar erst bei 200 % der TDI der Fall. Ein besseres Ansprechen im Sinne einer Zellzahlreduktion schon bei geringeren Zytostatikadosierungen zeigt sich bei Epirubicin und Paclitaxel.

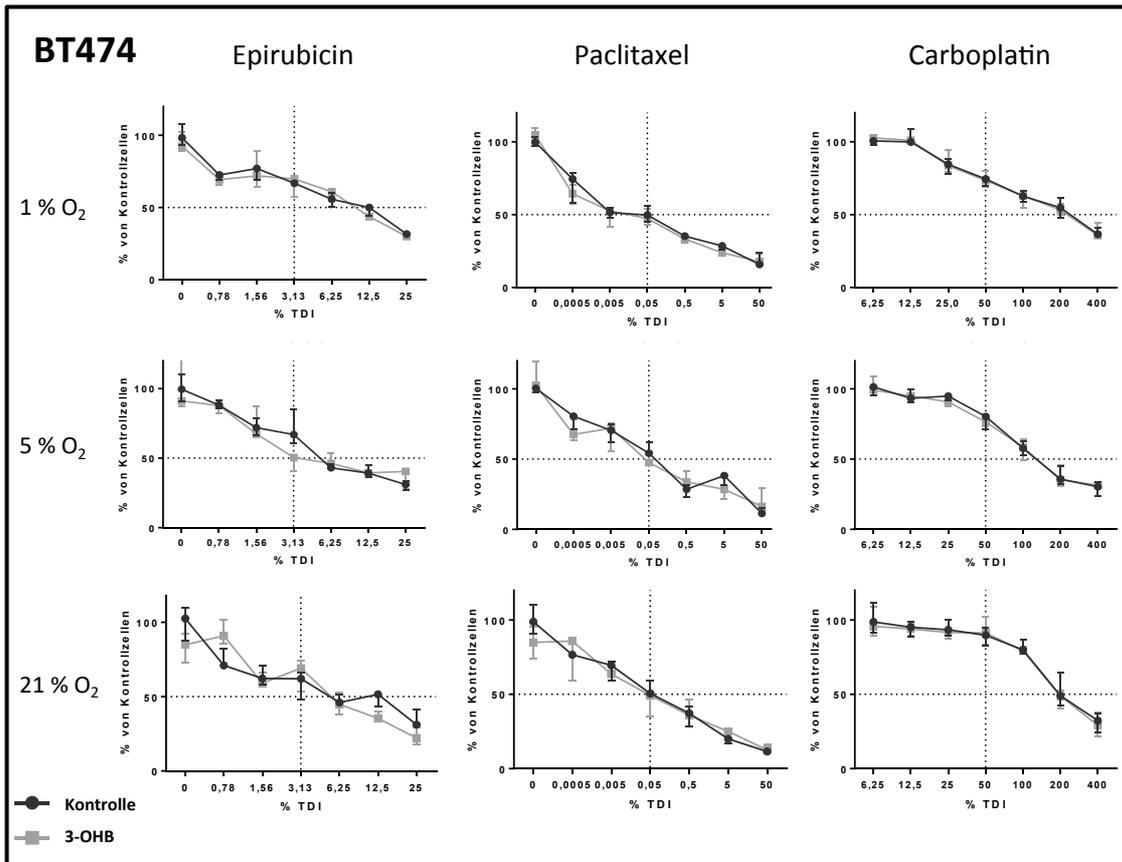


Abbildung 18: Veränderungen der Zellzahlen von BT474 nach chemotherapeutischer Behandlung mit Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin in verschiedenen Dosierungen.

Die im G5-Medium wachsenden Kontrollen sind den mit 3-OHB behandelten Zellen bei jeweils 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff gegenübergestellt.

Auch bei den Zellen der Linie **MCF-7** finden sich keine regelhaften Abweichungen der Zelldichte durch 3-OHB-Zugabe. Ebenso wie bei BT474 überlagern sich Kontrollkurven und 3-OHB-Kurven weitestgehend. Die Zellen reagierten jedoch auf alle drei Zytostatika sensibler als BT474, wie in Abbildung 19 und auch in Tabelle 3 zu sehen ist.

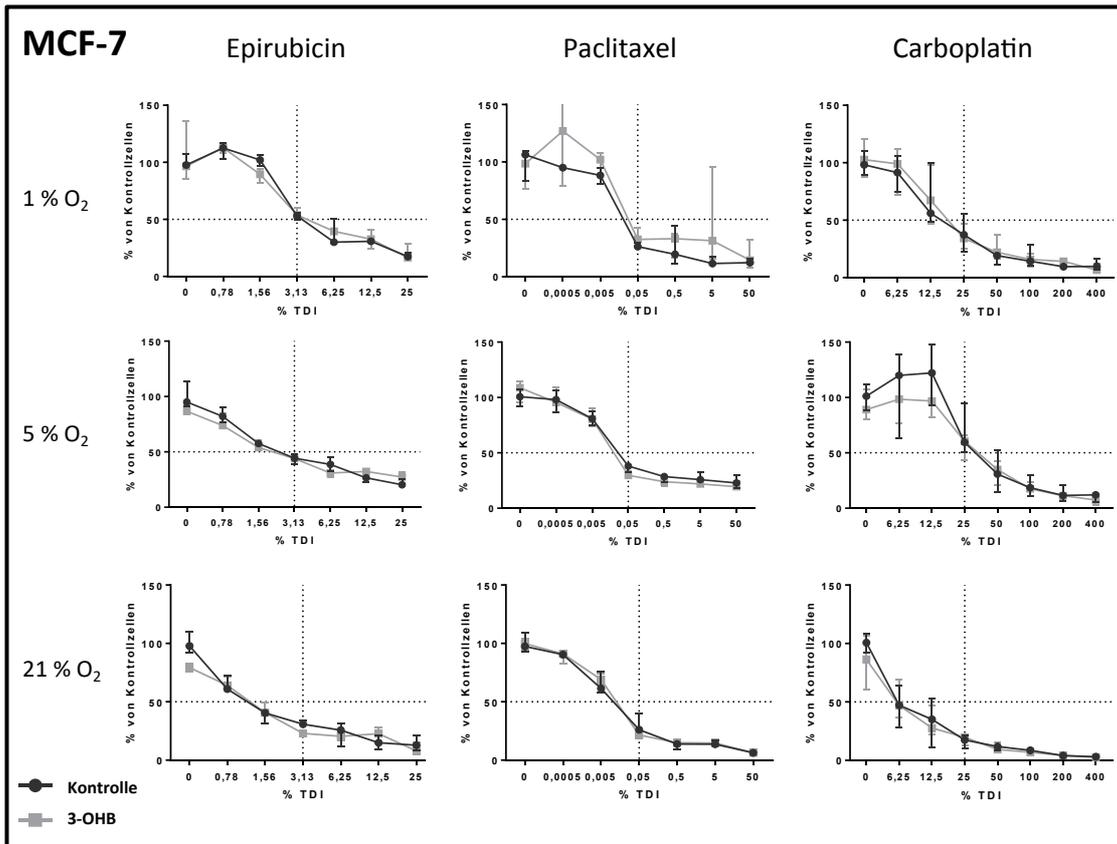


Abbildung 19: Veränderungen der Zellzahlen von MCF-7 nach chemotherapeutischer Behandlung mit Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin in verschiedenen Dosierungen.

Die im G5-Medium wachsenden Kontrollen sind den mit 3-OHB behandelten Zellen bei jeweils 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff gegenübergestellt.

Die Zelllinie **T47D** zeigt ein etwas heterogeneres Bild. In den Versuchen mit Epirubicin und Paclitaxel liegt die Kontrollkurve fast ausnahmslos oberhalb der 3-OHB-Kurve; bei gleichen Zytostatikakonzentrationen waren die in Kontrollmedium gewachsenen Zellen denen in 3-OHB-Medium also fast immer zahlenmäßig überlegen. Lediglich Werte und Kurven bei 21 % O<sub>2</sub> unter Epirubicin passen nicht ganz ins Bild. Bei 3,13 % der TDI findet sich ein Ausreißer, der die Kurve verfälscht und einem Messfehler oder einer Probenverunreinigung geschuldet sein könnte. Bezüglich der mit Carboplatin behandelten Zellen findet sich kein regelhafter Einfluss auf das Überleben der Zellen durch 3-OHB-Zugabe. Die Zelldichte erscheint im 3-OHB-Medium bei 1 %

O<sub>2</sub> ab einer TDI von 25 % leicht verringert. Bei den anderen beiden Sauerstoffbedingungen lässt sich jedoch, auch aufgrund vermehrter Schwankungen der Messergebnisse, kein eindeutiger Trend darstellen.

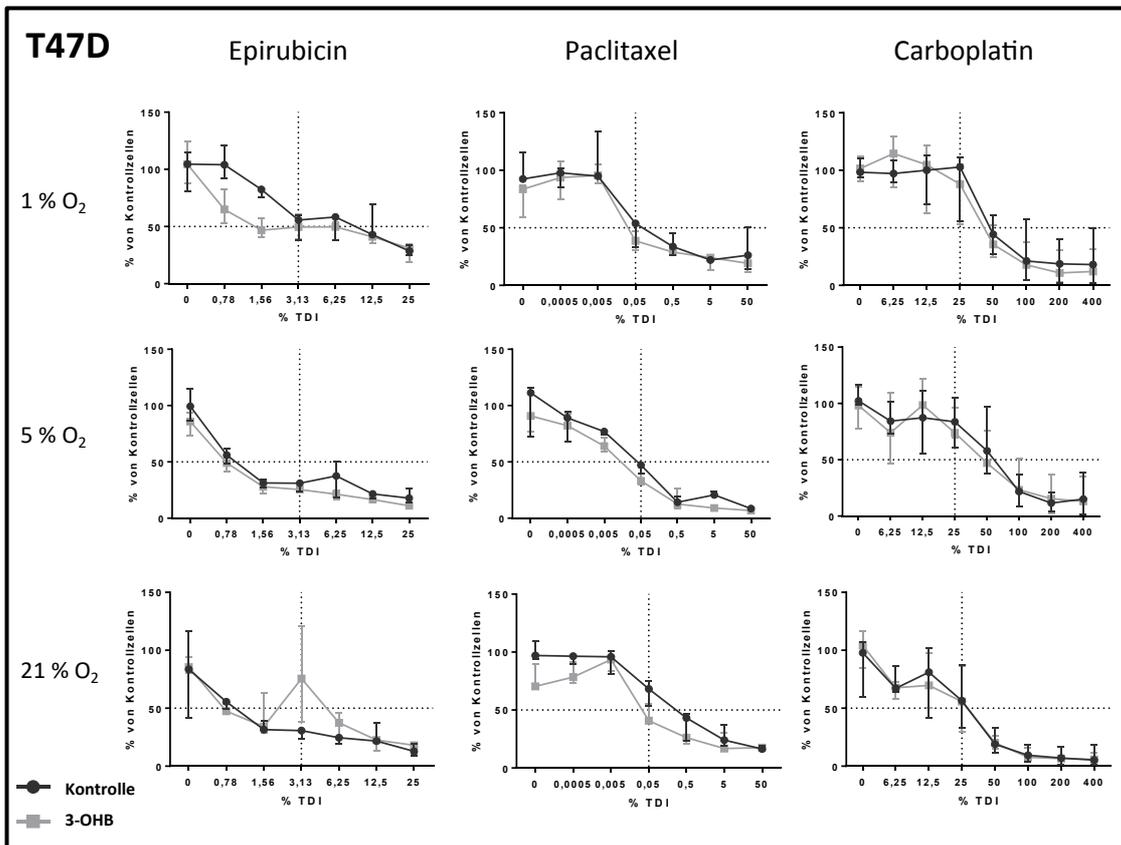


Abbildung 20: Veränderungen der Zellzahlen von T47D nach chemotherapeutischer Behandlung mit Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin in verschiedenen Dosierungen.

Die im G5-Medium wachsenden Kontrollen sind den mit 3-OHB behandelten Zellen bei jeweils 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff gegenübergestellt.

Bei der Zelllinie T47D fallen jedoch die IC 50-Werte auf: sie sind bei Zellen, die unter 3-OHB wuchsen, deutlich kleiner, was gleichbedeutend mit einer erhöhten Chemosensitivität ist. Bei der IC 50 handelt es sich um die minimale Hemmkonzentration; dies ist jene Konzentration des Zytostatikums, bei der noch die Hälfte der Zellen am Leben ist. Nimmt die IC 50 ab, sind also schon bei geringerer Dosis nur noch 50 % der Zellen vital und die Chemosensitivität wurde

gesteigert. Die entsprechenden Dosis-Wirkungskurven für T47D sind in Abbildung 21 noch einmal graphisch veranschaulicht dargestellt. Bei Epirubicin und Paclitaxel liegt die Kurve für 3-OHB fast regelhaft unterhalb der Kontrollkurve (erneut mit Ausnahme von 21 % O<sub>2</sub> unter Epirubicin), wodurch einmal mehr das verbesserte Ansprechen auf die Zytostatika deutlich wird.

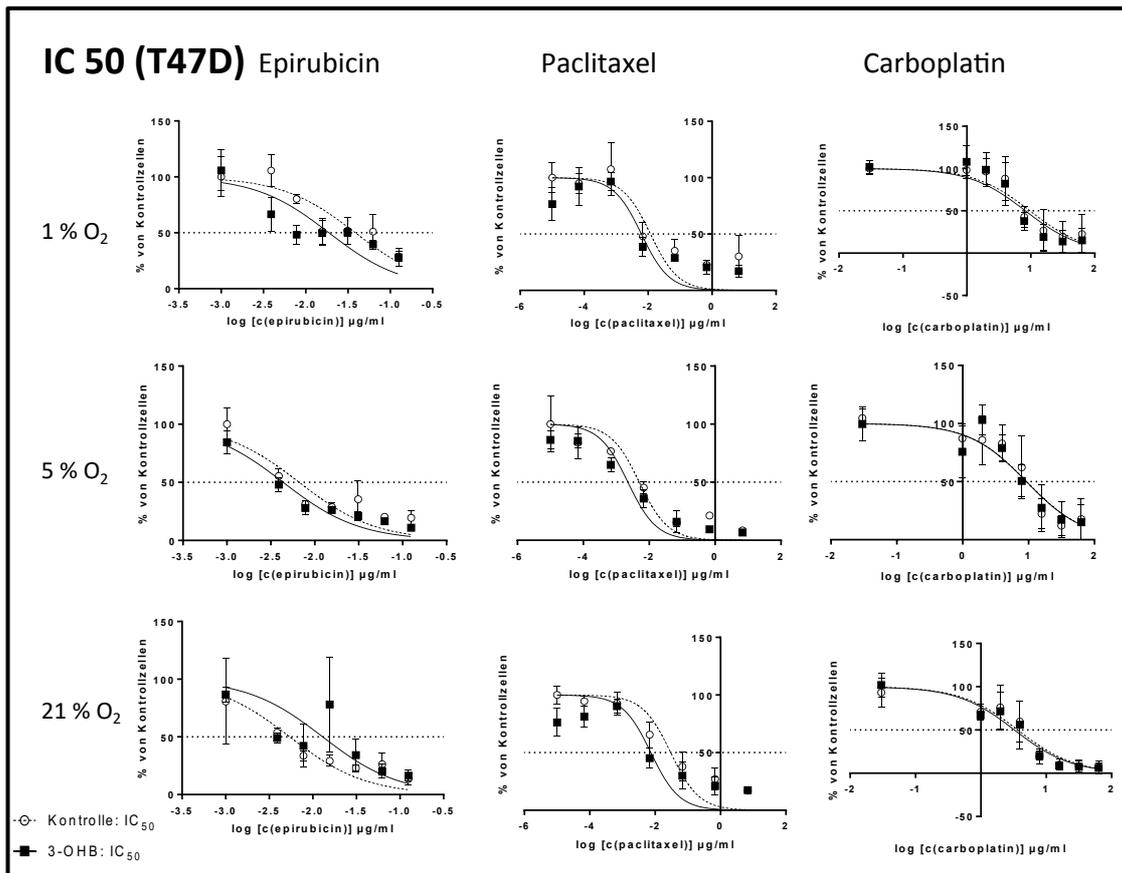


Abbildung 21: Veränderung der IC 50 von T47D in G5-Medium bzw. 3-OHB-Medium nach chemotherapeutischer Behandlung mit Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin in verschiedenen Dosierungen.

Es wurde der Logarithmus eines jeden Wertes der Dosisreihe gebildet und auf der x-Achse gegenüber der prozentualen Zellzahl auf der y-Achse aufgetragen.

Ersichtlich wird dies auch in Abbildung 22, welche die Veränderung der IC 50 bei den drei verwendeten Zytostatika in einem Säulendiagramm darstellt. Pro Zytostatikum und Sauerstoffbedingung wurden hier alle drei Zelllinien in einer graphischen Darstellung zusammengefasst, sodass sich der für T47D beobachtete Trend auch teilweise auf die beiden anderen Zelllinien ausweiten lässt. Die zelllinienübergreifende IC 50 konnte bei Paclitaxel durch Zugabe von 3-OHB unter allen getesteten Sauerstoffbedingungen verringert werden. Für Epirubicin zeigt sich dieser Effekt erneut nur bei 1 % und 5 % Umgebungssauerstoff. Die IC 50 der mit Carboplatin behandelten Zellen blieb nahezu unverändert, wenn auch eine dezente Verringerung durch 3-OHB-Zugabe zu beobachten ist. Tabelle 3 zeigt komplettierend die zugrundeliegenden IC 50-Werte. Die Veränderungen der IC 50 durch 3-OHB waren jedoch bei keiner der untersuchten Zelllinien signifikant.

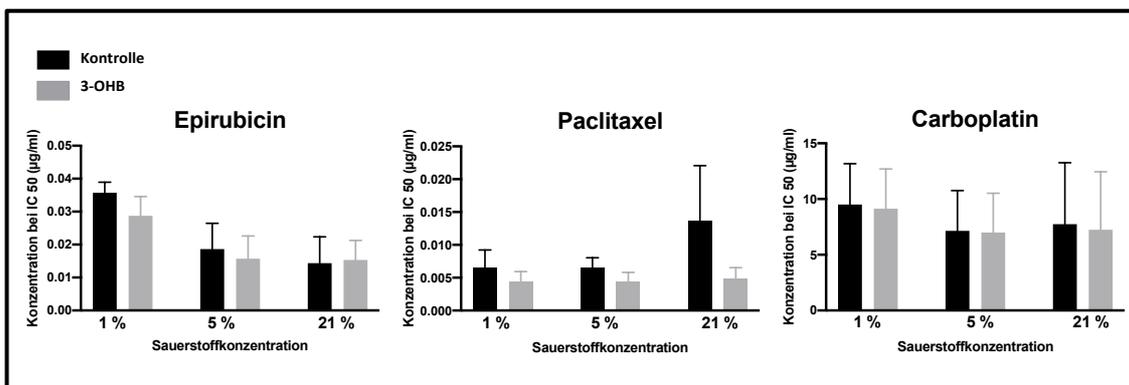


Abbildung 22: Veränderung der IC 50 bei den 3 verwendeten Zytostatika in Kontrollmedium im Vergleich zu mit 3-OHB versetztem Medium.

Für jedes Zytostatikum und jede Sauerstoffbedingung sind die Ergebnisse der drei untersuchten Zelllinien zusammengefasst.

IC 50		1 % O <sub>2</sub>		5 % O <sub>2</sub>		21 % O <sub>2</sub>	
		Kontrolle	3-OHB	Kontrolle	3-OHB	Kontrolle	3-OHB
Epirubicin	BT474	0,039	0,039	0,033	0,028	0,030	0,027
	MCF-7	0,029	0,028	0,016	0,015	0,007	0,006
	T47D	0,039	0,019	0,007	0,004	0,005	0,013
Paclitaxel	BT474	0,004	0,001	0,010	0,007	0,009	0,005
	MCF-7	0,004	0,006	0,005	0,003	0,002	0,002
	T47D	0,012	0,006	0,005	0,002	0,030	0,007
Carboplatin	BT474	15,74	15,71	11,99	11,65	18,65	17,56
	MCF-7	3,10	3,47	7,63	6,09	0,93	0,91
	T47D	9,70	8,23	9,35	9,26	3,66	3,26

*Tabelle 3: IC 50 Werte der untersuchten Zelllinien bei 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff in Kontrollmedium im Vergleich zu mit 3-OHB versetztem Medium.*

Im Fazit ändert die Zugabe von 3-OHB in einer hohen physiologischen Konzentration in zwei Fällen (BT474 und MCF-7) das Ansprechen der Zellen auf die Zytostatika nicht, und in einem Fall (T47D) konnte eine erhöhte, wenn auch nicht signifikant ausfallende Sensitivität beobachtet werden. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Radiosensitivitätstestungen lässt sich demnach feststellen, dass 3-OHB das Ansprechen der hier getesteten Brustkrebszellen auf Chemo- und Radiotherapie kaum verändert. Während bei der Bestrahlung nahezu gar keine Unterschiede zu den Kontrollversuchen zu verzeichnen waren, weist hinsichtlich der Chemotherapie lediglich die Zelllinie T47D unter 3-OHB-Einfluss eine erhöhte Sensitivität gegenüber zwei der eingesetzten Zytostatika auf.

## 4. Diskussion

### 4.1 Allgemeine Wachstumshemmung

Um etwaige Einflüsse einer ketogenen Diät auf das Überleben von Mammakarzinomzellen auf experimenteller Ebene zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit 3-OHB zur Behandlung der Zellen verwendet. Es sei jedoch, wie eingangs beschrieben, darauf hingewiesen, dass in der physiologischen Ketose neben Betahydroxybutyrat auch Acetoacetat und Aceton entstehen. Letzteres kann aufgrund energetischer Instabilität und entsprechend schnellem Zerfall vernachlässigt werden. Auch Acetoacetat spielt eine untergeordnete Rolle, da es zum einen in vivo während der Ketose in geringeren Konzentrationen als 3-OHB vorliegt (100, 106). Zum anderen kann es im experimentellen Rahmen nur als Lithiumsalz verwendet werden, was die Beurteilbarkeit und Rückschlüsse auf Effekte in vivo einschränkt. Daher wurde in unseren Versuchen ausschließlich 3-OHB zur Imitation der physiologischen Ketose eingesetzt.

Eine erste Annäherung an die Fragestellung, ob Betahydroxybutyrat das Tumorstadium von Brustkrebszellen in vitro negativ beeinflussen kann, stellten die Versuche zum Wachstumsvergleich über 7 und 14 Tage dar. Weder im kurzen noch im längeren Versuchsansatz konnte dabei ein signifikant vermindertes Zellwachstum festgestellt werden. Auch die verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 1 %, 5 % oder 21 % O<sub>2</sub> beeinflussten dieses Ergebnis nicht. Wenn auch die Auswertung des 14-tägigen Colony Forming Assay aufgrund starker Konfluenzen der einzelnen Kolonien keine absolute Aussage über die Koloniezahlen zuließ, war augenscheinlich kein deutlicher Trend zu verstärktem oder vermindertem Wachstum unter 3-OHB-Einfluss zu erkennen. In dieses Bild passen zudem die Ergebnisse des 7-tägigen Wachstumsvergleichs, der mittels des wesentlich genaueren BrdU- Tests ausgewertet wurde.

Ein wachstumshemmender Effekt, wie er in anderen in vitro- Versuchen (126-130) nachgewiesen wurde, konnte nicht reproduziert werden. Ebenso zeigte sich keine Wachstumsförderung durch 3-OHB, wie sie für genetisch modifizierte MDA-MB 231 Brustkrebszellen publiziert wurde (131). Einschränkend ist

bezüglich dieser Publikation allerdings anzuführen, dass kein 3-OHB zur Zellkultur zugegeben wurde, sondern eine zweite, gentechnisch modifizierte und somit zur 3-OHB-Produktion befähigte Zellart. Es erfolgte zudem keine Quantifizierung des entstandenen Betahydroxybutyrats, sodass fraglich bleibt, ob und wie viel 3-OHB Einfluss auf den Versuchsaufbau nehmen konnte.

Für die abweichenden Ergebnisse in unseren Versuchen sind mehrere Ursachen denkbar. Zum einen wurden in den Studien zwar neben einer genetisch modifizierten Brustkrebszelllinie (131) verschiedene Tumorentitäten wie Neuroblastom- (127), Kolonkarzinom- (130), Pankreaskarzinom- (126) und Histiozytomzellen (128) untersucht, nicht aber typische Brustkrebszellen wie in unserem Versuchsaufbau. Zum anderen bestehen Abweichungen in den verwendeten Stoffkonzentrationen der Glukose und der zugegebenen Ketonkörper. Weitere Punkte, die bei vergleichender Betrachtung der Studien bedacht werden müssen, sind außerdem die Versuchsdauer, die Art des verwendeten Ketonkörpers und die Sauerstoffbedingungen, unter denen die Zellen inkubiert wurden. Unser Ziel war es, dem klinischen Kontext möglichst nahe zu kommen. Da in zahlreichen Studien die Blutzuckerwerte durch ketogene Diät nur wenig gesenkt werden konnten (53, 103-105), wählten wir eine physiologische Glukosekonzentration von 5 mmol/l (entsprechend etwa 90 mg/dl) im Nährmedium. Auch bezüglich der 3-OHB-Konzentration orientierten wir uns an Werten, die physiologisch in der Ketose erreicht werden können und als therapeutisch sinnvoll gelten (107, 111, 132). Daher wählten wir 3 mmol/l als Versuchskonzentration. Bei Kadochi et al. (130) hemmte interessanterweise schon die Zugabe von 1 mM 3-OHB über einen Zeitraum von 48h bei einer physiologischen Glukosekonzentration von 100 mg/dl die Zellproliferation von Kolonkarzinomzellen. Bei Skinner et al. (127) wurden jedoch sehr hohe 3-OHB-Konzentrationen zwischen 24 und 43 mmol/l angewendet, während auch Magee et al. (129) ihre Versuchszellen mit supraphysiologischen 3-OHB-Konzentrationen zwischen 10 und 40 mmol/l behandelten. Shukla et al. (126) verwendeten Natrium-3-OHB in Konzentrationen zwischen 1 und 20 mmol/l, wobei die Tumorzellen durch Konzentrationen von 1 und 5 mmol/l noch kaum kompromittiert wurden; erst bei 20 mmol/l konnte eine signifikante

Wachstumshemmung verzeichnet werden. Die Ergebnisse der niedrigen Konzentrationen 1 und 5 mmol/l decken sich also mit den unsrigen. Sehr Ähnliches zeigten auch Maurer et al. (133); in deren Versuchen konnten Wachstum und Proliferation von Gliomzellen durch Inkubation mit 5 mM 3-OHB ebenfalls nicht beeinflusst werden.

Unsere Ergebnisse lassen also die Aussage zu, dass der Ketonkörper 3-OHB in physiologischer Konzentration das Wachstum der Brustkrebszellen MCF7, T47D und BT474 zwar nicht hemmt, es aber ebenso nicht fördert. Hier stellt sich die Frage nach der klinischen Bedeutung und Aussagekraft dieser Resultate. Gerade in vivo Mausversuche konnten wiederholt Antitumor-Effekte durch ketogene Diät oder Fasten zeigen (103, 128, 134-137) und auch protumoröse Wirkungen konnten demonstriert werden (138, 139). Im Kontext mit unseren Ergebnissen würde dies bedeuten, dass solche Effekte nicht oder nur zum Teil durch eine Interaktion von Ketonkörpern und Tumorzellen selbst bedingt werden, sondern dass der Fastenstoffwechsel als Ganzes Einfluss nimmt. Ferner ist zu bedenken, dass in einem in vitro- Modell möglicherweise lediglich die Effektorzellen und -organe für Antitumor-Effekte von Ketonkörpern fehlen könnten. Ein Beispiel hierfür stellen Insulin- oder IGF1-Konzentrationen dar. In vivo kommt es durch ketogene Diät zu verminderter Produktion der beiden Hormone (29) in Pankreas bzw. Leber. Daraus resultierende Alterationen in der Onkogen-Kaskade um PI3-Akt-mTOR (vgl. Abbildung 3) stellen eine tragende Rolle für Apoptose und Tumorstoffwechsel dar (67). Dies ist bei Tumorzellen in vitro nicht möglich und der Wegfall des für (Brust-) Krebszellen beschriebenen, wachstumsfördernden Effekts von Insulin (65, 140) kann in dem von uns verwendeten Modell nicht simuliert werden. Ähnlich verhält es sich mit Einflüssen auf die Tumervaskularisation: Im Mausmodell konnte unter Kalorienrestriktion eine verminderte Expression der angiogenetischen Faktoren VEGF1 und 2 nachgewiesen werden (141), was in einem in vitro-Versuch ohne tumorversorgende Blutgefäße und Angiogenese jedoch nicht ins Gewicht fallen kann. Gleiches gilt für einen modulierenden Effekt von Ketonkörpern auf das Immunsystem (52, 119), auf Entzündungsreaktionen (118) und auf Makrophagen als Effektorzellen (117).

Im Umkehrschluss bedeutet diese Annahme aber auch, dass etwaige indirekt vermittelte wachstumsfördernde Einflüsse auf Krebszellen durch unser Modell ebenso nicht ausgeschlossen werden können. Erfreulicherweise deuten die meisten klinischen Arbeiten (53) jedoch darauf hin, dass Ketonkörper auch in vivo beim Menschen das Tumorstadium nicht fördern (5, 53, 99, 142-144). Klement (122) analysiert in einem Review (von 2017) 24 klinische Studien und stellt lediglich bei einer Arbeit (entspricht 4 %) mit kleiner Fallzahl einen Pro-Tumor-Effekt fest (145). Weiterhin besteht hier allerdings Forschungsbedarf an randomisiert kontrollierten Studien.

## **4.2 Energetisches Profil**

Das Wachstum von Tumorzellen ist eng mit ihrem Energiestoffwechsel verknüpft. Wie eingangs erläutert, ist es von großer Bedeutung, ob die Zellen zur Energiegewinnung aerobe Glykolyse, oxidative Phosphorylierung oder gar eine Verwertung von Ketonkörpern betreiben. Es wurden zunächst bei den unbehandelten Kontrollzellen Glukose- und Laktatkonzentrationen unter den drei verschiedenen Sauerstoffkonditionen gemessen, um Rückschlüsse auf ihr energetisches Profil zu ziehen. Die Messungen demonstrierten bei allen drei Zelllinien deutlich den Warburg-Effekt: bei allen getesteten Sauerstoffkonzentrationen, also auch bei 21 % O<sub>2</sub>, war Laktat als Korrelat der Glykolyse bzw. Fermentation messbar. Zudem blieben die produzierten Laktatmengen unabhängig vom Sauerstoffangebot innerhalb der einzelnen Zelllinien weitestgehend konstant, sodass es keinen Hinweis auf eine verstärkt ablaufende Glykolyse bei den hypoxischen Versuchsansätzen (1 % und 5 % O<sub>2</sub>) gab. Daraus lässt sich schließen, dass die Rate der Glykolyse in Tumorzellen auch bei Normoxie in vergleichbarem Umfang wie bei Hypoxie liegt und die Zellen damit dem Warburg-Effekt folgen. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass Krebszellen auch auf Glutamin als Energiequelle zurückgreifen können, welches anschließend über Pyruvat in Laktat umgewandelt werden kann (146, 147). Da die verwendeten Zellkulturmedien ebenfalls Glutamin enthalten,

könnten die verzeichneten Laktatwerte anteilig auch auf diesem alternativen Stoffwechselweg entstanden sein.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Zugabe von 3-OHB diese Stoffwechsellage verändern würde. Bei den entsprechend mit 3-OHB behandelten Zellen konnte jedoch keine signifikante Abnahme des Glukoseverbrauchs oder der Laktatproduktion verzeichnet werden. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Resultaten von Shukla et al. (126), die in vitro unter Natriumhydroxybutyrat-Einfluss einen reduzierten Glukoseumsatz bei verminderter Glukoseaufnahme und Laktatsekretion feststellen konnten. Allerdings kamen diese Effekte einmal mehr bei unphysiologisch hohen Ketonkörperkonzentrationen von 10 und 20 mM zustande und es handelte sich um Pankreaskarzinomzellen. Auch Fine et al. (144) zeigten eine verminderte ATP-Produktion in verschiedenen Krebszellen bei Behandlung mit Ketonkörpern und hielten eine gehemmte Glykolyse für eine denkbare Ursache. Jedoch verwendeten sie Acetoacetat, welches zudem suprphysiologisch hoch (10 mM) dosiert war. Es bleibt also fraglich, ob die Glykolyse in malignen Zellen durch Ketonkörper per se gehemmt wird, oder ob ein in vivo verminderter Glukoseumsatz unter ketogener Diät schlichtweg dem herabgesetzten Glukoseangebot sowie der reduzierten Insulinsekretion und -wirkung geschuldet ist. Zumindest schließt auch hier ein fehlender Nachweis einer direkten Hemmung durch 3-OHB eine indirekte Hemmung über das Zusammenspiel komplexerer Signalwege im Gesamtorganismus nicht aus.

Da ein etwaiger Effekt von 3-OHB auf Tumorzellen auch von dessen Verwertung in den Zellen abhängen könnte, wurden neben Glukose und Laktat auch die Konzentrationen von verbliebenem 3-OHB nach 7 Tagen in den Zellkulturansätzen gemessen. Die beiden Zelllinien BT474 und T47D zeigten eine Abnahme der Ketonkörperkonzentration, was für einen Metabolismus von 3-OHB durch die Zellen spricht. MCF-7 hingegen konnte 3-OHB nicht verwerten; auch am Ende der Versuchsreihe lag der Ketonkörper noch in seiner Ausgangskonzentration vor. Interessant gestaltet sich hier auch der Einfluss des Sauerstoffangebots auf die Verwertung von 3-OHB. Während Otto et al. (112)

bei ihren Untersuchungen an Tumorzellen den Gastrointestinaltrakts einen verminderten Ketonkörperabbau unter Hypoxie verzeichnen konnten, blieb dieser Effekt in unseren Versuchen aus.

Rodrigues et al. (139) betrachteten ebenfalls den Zusammenhang von Ketonkörperverbrauch und pro- bzw. antitumorösen Effekten. Sie sprechen dabei vom „Betahydroxybutyrat- Paradoxon“: Bei Zellen, die dem Warburg Effekt folgen und auf Energiegewinnung aus aerober Glykolyse angewiesen sind, reichere sich das 3-OHB an und könne antitumoröse Effekte wie die Inhibierung von Histondeacetylasen (HDAC) bedingen. Bei gesunden Zellen oder bei Tumorzellen, die neben der Fermentation auch Ketonkörper als alternative Energiequelle nutzen können, werde 3-OHB verbraucht, akkumuliere nicht und könne die Zellproliferation nicht negativ beeinflussen. Stattdessen diene es sogar noch als energiereiches Substrat und wirke dadurch wachstumsfördernd. Dieser Zusammenhang kann hier insofern nicht bestätigt werden, als 3-OHB bei T47D und BT474 zwar verbraucht wurde und keine antitumorösen Effekte festzustellen waren, aber gleichzeitig unverändert viel Laktat als Zeichen für aerobe Glykolyse messbar war. Die Zellen schienen also weiterhin in unverändertem Maße Glukose umzusetzen, auch wenn erneut die mögliche Laktatbildung aus Glutamin bedacht werden muss. Hätten die Zellen aber ihre glykolytische Aktivität zugunsten des gewinnbringenderen Metabolismus von 3-OHB gedrosselt, so wäre gemäß dem Paradoxon auch ein proliferationsfördernder Effekt zu erwarten gewesen. Eine solche Wirkung konnte jedoch nicht festgestellt werden. Ebenfalls nicht ins Bild des „3-OHB-Paradoxons“ passen die Messungen bei MCF-7: bei zwar minimalem Ketonkörperverbrauch und entsprechend hohen resultierenden 3-OHB-Konzentrationen konnte dennoch keine proliferationshemmende Wirkung auf die Tumorzellen verzeichnet werden. Diese Beobachtung bleibt jedoch rein deskriptiv, da der Beitrag einzelner Metabolite zum Gesamtstoffwechsel hier nicht aufgelöst werden kann.

Untrennbar vom metabolischen Profil der Karzinomzellen ist auch die Frage, ob die Zellen Enzyme zur ertragreichen Verwertung von Ketonkörpern besitzen. Erst das Vorhandensein der Enzyme BDH, SCOT und ACAT macht eine Ketolyse und

anschließende Energiegewinnung aus den Produkten möglich (vgl. Abbildung 5). Wie bereits erwähnt, verzeichnete die Zelllinie MCF-7 in unseren Versuchen keinen 3-OHB-Verbrauch, was zu den Ergebnissen von Bartmann et al. (16) passt. Sie fanden bei MCF-7 nur eine sehr spärliche mRNA Expression für die entsprechenden Enzyme. Auch die bei Bartmann et al. erhöhte Expression von SCOT, BDH und ACAT in Zellen der Linie BT474 deckt sich mit dem deutlichen Ketonkörperverbrauch von BT474 in unseren Versuchen. Die Bedeutung vorhandener Enzyme für die Klinik verbleibt jedoch nicht vollends geklärt. Zhang et al. (114) konnten im Mausmodell bei Xenograft- Tumoren mit herabregulierten ketolytischen Enzymen ein verbessertes Ansprechen auf ketogene Diät feststellen. Ebenso vermuteten Chang et al. (113) bei verminderter Enzymexpression eine erhöhte Sensitivität gegenüber der diätischen Intervention. Diese Annahmen stünden erneut im Einklang mit dem oben erläuterten 3-OHB-Paradoxon. In unserem in vitro Modell war eine mangelnde Verwertung von Ketonkörpern jedoch nicht an ein gehemmtes Wachstumsverhalten geknüpft. Der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus in vitro- und Tierversuchen auf den menschlichen Organismus sind allerdings auch hier Grenzen gesetzt, sodass die Thematik gerade im klinischen Umfeld weiter beleuchtet werden sollte.

### **4.3 Einfluss auf Radiotherapie**

Da in der Regel jede in kurativer Absicht behandelte Brustkrebspatientin eine Chemotherapie und /oder Bestrahlung erhält (11), untersuchten wir auch den Einfluss von 3-OHB auf Brustkrebszellen bei simultaner Chemo- bzw. Radiotherapie.

Ähnlich wie in den Versuchen zum Tumorwachstum unter 3-OHB konnte durch Ketonkörperzugabe kein signifikant verändertes Ansprechen auf eine Bestrahlung festgestellt werden. Dem gegenüber stehen zahlreiche Studien, die einen verstärkten Effekt von Radiotherapie durch Ketonkörper, ketogene Diät oder Fasten in vitro und in vivo belegen (148-154). Auch eine theoretische Annäherung an die Thematik erscheint vielversprechend: Eine Bestrahlung kann Tumorzellen direkt durch Ionisation oder indirekt durch die Bildung reaktiver

oxidativer Sauerstoffspezies (ROS) schädigen (155). Im Zusammenhang mit ketogener Diät ist vor allem die Entstehung oxidativen Stresses durch die ionisierende Strahlung von maßgeblicher Bedeutung. Da Tumorzellen oft strukturell sowie funktionell veränderte Mitochondrien und somit auch eine fehlerhafte Zellatmung aufweisen (44, 45, 156), sind sie ohnehin in erhöhtem Maße oxidativem Stress durch freie Radikale ausgesetzt (46). Diesen Zustand kompensieren sie, dem Warburg Effekt folgend, durch vermehrte aerobe Glykolyse; zum einen wird dadurch der Weg der oxidativen Phosphorylierung in den dysfunktionalen Mitochondrien umgangen, sodass es vermindert zur Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten kommt. Zum anderen wird durch die gesteigerte Glykolyse NADPH und letztlich Glutathion generiert, welches zur Beseitigung freier Radikale beiträgt und die Zelle vor oxidativem Stress schützt. Wird der Zelle nun dieser Kompensationsmechanismus entzogen, beispielsweise durch Restriktion des Glukoseangebots, so sollte der oxidative Stress in der Folge ansteigen. Daraus ginge ein Synergismus von ketogener Diät und Radiotherapie hervor. Dieser könnte zudem noch dadurch verstärkt werden, dass 3-OHB durch die Hemmung von HDAC in gesunden Zellen das Potential besitzt, diese vor ROS zu schützen (121, 155). Ein zusätzlicher Schutzmechanismus einer ketogenen Diät liegt in der Produktion von mitochondrialen „Uncoupling Proteinen“ (UCP), die zu einer Entkopplung der Atmungskette und infolgedessen verminderter ROS-Entstehung führen (157). Allerdings zeigen all diese Überlegungen auch bereits die Grenzen eines in vitro Versuchs auf. Durch Zugabe von 3-OHB in vitro kann lediglich der direkte Effekt des Ketonkörpers während einer Bestrahlung beurteilt werden, nicht aber der gesamte Fastenstoffwechsel simuliert werden. Auch der Einfluss von 3-OHB auf gesunde Zellen konnte in unseren Versuchen nicht untersucht werden, da nur maligne Tumorzellen kultiviert wurden. Dennoch erlaubt der Versuchsaufbau die Aussage, dass Betahydroxybutyrat per se keinen hemmenden Einfluss auf den Effekt einer Bestrahlung auf Brustkrebszellen hat. Diese Aussagekraft ist nicht zu vernachlässigen, da ein nicht unwesentlicher Teil der Patientinnen mit Mammakarzinom auch eine Bestrahlung erhalten muss. Würde eine zeitgleich durchgeführte ketogene Diät die Wirkung einer Bestrahlung minimieren, so

würde dies das zeitliche Fenster für die Diät erheblich schmälern und ihren Nutzen in Frage stellen. Rossi et al. (152) untersuchten ähnlich wie wir den Einfluss von 3-OHB auf Gliomzellen in vitro und fanden Hinweise dafür, dass 3-OHB als Radiosensitizer wirkt. Allerdings konnten sie nur nach 24-stündiger Inkubation mit 10 mM Betahydroxybutyrat und anschließender Bestrahlung mit 4 Gray eine Wachstumsminde rung gegenüber den Kontrollen feststellen; bei einer 3-OHB-Konzentration von 5 mM und gleichem Versuchsaufbau gelang dies nicht. Letzteres Ergebnis deckt sich wiederum mit unseren Versuchen bei 3 mM 3-OHB. Interessanterweise konnten Rossi et al. jedoch einen Überlebensnachteil der Zellkolonien bei einer 7-tägigen Inkubation mit 5 mM 3-OHB im Anschluss an die Bestrahlung zeigen. Die zeitliche Reihenfolge von Bestrahlung und 3-OHB-Zugabe könnte also eine Rolle spielen. Allen et al. (148) setzten in ihrer Versuchsreihe Lungenkarzinomzellen für 24 Stunden einer Mischung aus 3 mM 3-OHB und 1,6 mM Acetoacetat aus und schlossen eine Bestrahlung mit 0,5 bis 4 Gray an. Auch hier fanden sich, wie in unseren Versuchen, keine Effekte hinsichtlich des Ansprechens auf die Radiotherapie. Ebenso untermauern zahlreiche in vivo- Experimente die Annahme, dass 3-OHB keinen hemmenden Einfluss auf die Wirkung einer Bestrahlung hat. Bis dato findet sich keine Arbeit, die eine Wirkungsminderung von ionisierender Strahlung durch Ketone, ketogene Diät oder Fasten beschreibt (92). Im Gegenteil machen aktuelle Untersuchungen am Mausmodell Hoffnung auf positive Auswirkungen einer ketogenen Diät als adjuvante Therapie (148-154). Besonders vielversprechend erscheint an dieser Stelle die Arbeit von Allen et al. (148), die neben den oben beschriebenen in vitro-Versuchen auch die gleichen Zelllinien in Xenografts an Mäusen unter ketogener Diät untersuchten. Die tumortragenden Tiere, die zusätzlich zur Bestrahlung mit insgesamt 12 Gray eine ketogene Diät erhielten, wiesen signifikante Retardierungen im Tumorstadium sowie signifikant verbesserte Überlebensraten auf. Dadurch zeigt die Arbeit von Allen et al. auf, dass ein fehlender tumorhemmender Einfluss in vitro selbigen in vivo nicht ausschließt. Der nächste Schritt wäre nun, die im Mausmodell erlangten Erkenntnisse auch in klinischen Studien zu untersuchen.

#### 4.4 Einfluss auf Chemotherapie

Auch die Chemotherapie stellt eine wichtige Säule in der Behandlung von Brustkrebs dar, weshalb in dieser Arbeit geklärt werden sollte, ob Betahydroxybutyrat per se den Effekt der Zytostatika Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin beeinflussen kann. Wie auch bei den Versuchen zur Bestrahlung erbrachte hier die Zugabe von 3-OHB bei MCF-7 und BT474 kein verändertes Ansprechen auf die zytostatische Therapie. Lediglich bei T47D konnte eine, wenn auch nicht signifikante, Wirkungsverstärkung von Epirubicin und Paclitaxel unter 3-OHB-Einfluss gemessen werden. Zur Beurteilung dieser Ergebnisse ist neben der Tumorzelllinie vor allem die Art des eingesetzten Zytostatikums von Bedeutung. In unseren Versuchen wurden die in der Brustkrebstherapie gängigen Wirkstoffe Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin eingesetzt und in je 6 unterschiedlichen Dosen appliziert. Um auch hier der klinischen Situation möglichst nahe zu kommen, wurden solche Konzentrationen gewählt, die im Rahmen einer Therapie tatsächlich im Plasma vorliegen (114, 123-125). Ähnlich wie die Bestrahlung zielt auch die Chemotherapie unter anderem auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffmetabolite ab, sodass ein synergistischer Effekt mit ketogener Diät denkbar wäre. Aufgrund von unterschiedlichen Wirkweisen bedingen die drei verwendeten Zytostatika die Bildung oxidativen Stresses aber nicht in gleichem Maße. Während das Anthrazyklin Epirubicin und die Platinverbindung Carboplatin ganz oben in der Liste der Stressoren rangieren, ist das Taxan Paclitaxel nur für geringen oxidativen Stress verantwortlich (158). Dementsprechend wäre ein im Gegensatz zu Epirubicin und Carboplatin verminderter Effekt von 3-OHB als Chemosensitizer bei Paclitaxel zu erwarten gewesen. Allerdings erschien der Einfluss von 3-OHB auf die Überlebenskurven in unseren Versuchen bei allen drei Zelllinien unabhängig vom verwendeten Zytostatikum, sodass in Frage gestellt werden kann, ob in den Zellkulturen überhaupt oxidativer Stress durch 3-OHB entstanden ist. Erneut sei jedoch darauf hingewiesen, dass wir durch unsere Versuche nur den Einfluss von Betahydroxybutyrat per se auf das Ansprechen der Tumorzellen evaluieren konnten, wodurch etwaige indirekt über den Organismus vermittelte Effekte außen vor bleiben. Während sich kaum vergleichbare in vitro Versuche finden,

existieren zumindest einige relevante Arbeiten mit Tiermodellen. Hadzic et al. (159) testeten im Mausversuch das Ansprechen von Brustkrebszellen auf die Kombination aus Paclitaxel mit einem Inhibitor des Glukosestoffwechsels (2-Desoxy-D-Glukose, 2DG) im Vergleich zu Paclitaxel allein. 2DG, welches ähnliche Wirkungen nach sich zieht wie eine diätische Glukoseresrestriktion, machte die Zellen dabei anfälliger für die Chemotherapie. Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass es sich unter anderem um Zellen der Linie T47D handelte. Dieses Ergebnis deckt sich mit unseren Beobachtungen bezüglich der Zelllinie. Bei der Mehrzahl der Arbeiten, die eine Erhöhung der Chemosensitivität durch diätische Maßnahmen untersuchen, handelt es sich jedoch um Tierversuche in Verbindung mit kurzzeitigem Fasten (Short-Term-Fasting, STF). Die Datenlage ist dabei etwas kontroverser als bei Studien zur Bestrahlung, was zum Teil der Diversität der untersuchten Krebsarten, Zytostatika und Therapieschemata geschuldet sein könnte. Dennoch findet sich in der Mehrzahl der Mausversuche ein verbessertes Ansprechen auf Chemotherapie durch Fasten (92, 151, 160-164) oder ketogene Diät (165). Arbeiten, die keine erhöhte Chemosensitivität nachweisen konnten, zeigten mitunter trotzdem eine bessere Verträglichkeit oder gar einen Schutz gesunder Zellen durch die diätische Intervention (166, 167). Die Forschungsgruppe um Longo und Raffaghello spricht dabei von „differentieller Stressresistenz“: während kurzzeitiges Fasten für eine erhöhte Stressresistenz in gesunden Zellen sorgt, greift dieser Mechanismus in Krebszellen nicht. Raffaghello et al. halten eine reduzierte Aktivierung von Akt und Ras aufgrund verminderter IGF- Spiegel für eine mögliche Erklärung der verbesserten Stressresistenz (166). Unser Versuchsaufbau ließ Rückschlüsse auf den Einfluss auf gesunde Zellen jedoch nicht zu. Klement gibt in seinem Review eine gute Übersicht über jüngste in vivo Arbeiten an Mäusen (92). Auch wenn sich ein Trend in Richtung erhöhter Chemosensitivität von Tumorzellen abzuzeichnen scheint, sei die gerade bezüglich des Glukosestoffwechsels limitierte Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Mausversuchen auf den Menschen erwähnt (168).

Aktuell ist die Datenlage an klinischen Studien in Bezug auf die Kombination einer ketogenen Diät mit Chemotherapie noch sehr ausbaufähig. Eine

Annäherung an die Thematik stellt eine Studie von DeGroot et al. (169) dar, die den Einfluss von kurzzeitigem Fasten 24 Stunden vor bis 24 Stunden nach einer zytostatischen Therapie mit Docetaxel, Doxorubicin und Cyclophosphamid untersuchten. Dabei konnten sie eine verminderte hämatologische Toxizität der Therapie auf gesunde Zellen feststellen. Ähnliche Ergebnisse bezüglich abgeschwächter Nebenwirkungen erhielten auch Dorff et al. (170) in einer weiteren klinischen Studie, die die Wirkung von Kurzzeitfasten in Verbindung mit platinhaltiger Chemotherapie untersuchte. Gerade bezüglich des Einsatzes einer ketogenen Diät als Zusatz zur Chemotherapie besteht folglich noch reichlich klinischer Forschungsbedarf. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch eine Untersuchung der Dreifachkombination aus Ketogener Diät, Radiotherapie und Chemotherapie, wie sie im klinischen Alltag auftreten könnte.

#### **4.5 Ketogene Diät als sinnvolle, unbedenkliche Ergänzung?**

Um eine ketogene Diät als adjuvante Therapie zum Standardschema empfehlen zu können, müssen verschiedene Punkte geklärt werden. Dies sind neben erwünschten Wirkungen und Nebenwirkungen der Behandlung auch Machbarkeit, Compliance und Einflüsse auf die Lebensqualität der Erkrankten. Als erstes stellt sich also die Frage nach der Anti-Tumor-Wirkung einer ketogenen Diät bei Brustkrebs. Wie bereits erläutert existieren in Bezug auf das Mammakarzinom noch wenige aussagekräftige Studien. Beispielsweise untersuchten Ilykesici et al. (171) den Effekt von Chemotherapie, Insulingabe, ketogener Diät, hyperbarer O<sub>2</sub>- und Hyperthermiebehandlung an nur einer einzigen Patientin. Präklinische Arbeiten mit Mausmodellen für andere Tumorarten sprechen eher für eine krebshemmende Wirkung (92) sowie für einen synergistischen Effekt mit Radio- und Chemotherapie (s.o.). Die Datenlage bezüglich klinischer Arbeiten ist allerdings etwas dünn, sodass Erickson et al. (172) in ihrem systematischen Review die Aussagekraft bisheriger klinischer Studien anzweifeln. Sie bemängeln geringe Fallzahlen, hohe Drop-out-Raten und fehlende Standardisierung der diätischen Interventionen und Protokolle. Im Gegensatz dazu findet Klement (122) in seinem Review in 42 % der untersuchten

Studien einen Anti-Tumor-Effekt. Wie auch Weber et al. (173) schon postulierten, bedarf es auf diesem Gebiet dringend weiterer klinischer Arbeiten, die die Auswirkungen einer ketogenen Diät malignitätsspezifisch in Form von randomisiert kontrollierten Studien erforschen.

Auch wenn ein hemmender Einfluss auf Tumorwachstum und -ausbreitung nicht sicher zu erwarten ist, könnten betroffene Patienten auch auf anderer Ebene von einer ketogenen Diät profitieren. Wichtige Elemente in der supportiven Behandlung von Tumorkranken sind etwa die Stabilisierung des Körpergewichts und die Vermeidung einer Kachexie. Die Kachexie kann als Syndrom eines tumorbedingt veränderten Stoffwechsels beschrieben werden, das in der Abnahme von Fett- und Muskelgewebe resultiert (126). Viele Patienten erleben im Laufe ihrer Erkrankung oder sogar noch vor Diagnosestellung einen ungewollten Gewichtsverlust. Diese tumorassoziierte Kachexie ist oft mit verschlechterter Lebensqualität sowie vermindertem Ansprechen auf Chemotherapie verbunden (174, 175) und auch Zytostatika wie beispielsweise Taxane können eine Kachexie ihrerseits zusätzlich verstärken (176). Die Tatsache, dass bis zu 20 % der Krebstode dem Kachexiesyndrom geschuldet sind (177), unterstreicht eindrücklich die Bedeutung des Kachexiemanagements. Die Abnahme des Körpergewichts wird über verschiedene, noch nicht gänzlich verstandene Mechanismen vermittelt. Neben proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  (174) spielt vermutlich die Insulinresistenz eine entscheidende Rolle; bei fehlender Insulinwirkung kommt es zu verminderter Glukoseaufnahme in die Muskelzellen und zu gestörter Glukoseverwertung (178). Während Leber und Muskulatur in reduziertem Umfang Glykogensynthese betreiben, benötigt die Leber fortlaufend Substrate für die stattdessen ungehindert ablaufende Glukoneogenese. Es kommt zur Lipolyse sowie zur Proteinolyse, um der Leber Glycerin und freie Aminosäuren für die Syntheseleistung bereitstellen zu können. An dieser Stelle könnte durch eine ketogene Diät interveniert werden: sie könnte die Insulinresistenz reduzieren (110) und über negative Feedbackmechanismen die Lipolyse in Adipozyten hemmen (90). Gleichzeitig sorgt sie für die Bereitstellung von alternativen, effizienten Energiequellen in Form von Nahrungsfetten und 3-OHB

und senkt somit den Bedarf an weiterer Glukoneogenese. Der daraus resultierende Effekt einer eingedämmten Proteinolyse im Muskelgewebe konnte in Mausmodellen bereits beobachtet werden (126, 136, 179-181) und wird derzeit auch in klinischen Studien untersucht. Zwischenergebnisse der KETCOMP Studie von Klement et al. (182) deuten auf eine verbesserte Körperkonstitution von Krebspatienten unter ketogener Diät hin.

Eine dritte elementare Frage ist die nach unerwünschten Wirkungen einer ketogenen Diät, lautet doch eine der obersten Maximen in der Medizin „Primum nil nocere“. „In erster Linie nicht schaden“ soll eine Therapie, wie vermutlich schon die alten Römer es formulierten. Durch den langjährigen Einsatz ketogener Diät in der Epilepsietherapie und auch durch das aktuell zunehmende Forschungsinteresse wurden die Nebenwirkungen einer solchen Diät intensiv untersucht. Zu akuten, zum Teil therapielimitierenden unerwünschten Wirkungen zählen gerade bei Kindern Übelkeit, Lethargie und Hypoglykämien (183). Mögliche, aber seltene chronische Nebenwirkungen sind vor allem gastrointestinale Beschwerden wie Obstipation, Wachstumsretardierung oder die Entwicklung von Nierensteinen (95, 183, 184), was unter anderem auch an der Zusammensetzung der bisher verwendeten Formulardiäten liegen könnte. Bei Erwachsenen treten solche Nebenwirkungen eher in reduziertem Umfang auf und sind oft besser tolerierbar (95). Bei ihnen sind allerdings besonders die Blutfettwerte von Belang. Im Hinblick auf die enorme Fettzufuhr besteht vermehrt die Sorge einer möglichen LDL-Cholesterin- Erhöhung und eines konsekutiv erhöhten kardiovaskulären Risikos. Die Studienlage ist hier jedoch nicht eindeutig; während einige Arbeiten einen Anstieg des LDL belegen (185-187), zeigen andere sogar verbesserte Triglycerid-, HDL- und/ oder LDL-Werte durch die diätische Intervention (5, 188-194). Volek et al. (195) empfehlen die ketogene Diät sogar als Therapie bei metabolischem Syndrom und zur Senkung des kardiovaskulären Risikos. Sie zerstreuen die Bedenken bezüglich Dyslipidämie und Atherogenese mit der Argumentation einer veränderten Fettsäureverarbeitung bei Kohlenhydratrestriktion: Solange Blutzucker- und Insulinkonzentrationen reduziert seien, führe eine erhöhte Fettsäureaufnahme nicht zu vermehrter Lipogenese, sondern gegenteilig über PPAR $\alpha$  zu

gesteigerter Fettsäureoxidation bei gleichzeitig reduzierter Lipogenese (vgl. Abbildung 6). Bei der Bewertung der Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten muss allerdings bedacht werden, dass sich die jeweiligen Interventionszeiträume unterschieden und einige Studien an gesunden Erwachsenen durchgeführt wurden (186, 191), andere dagegen an übergewichtigen Patienten (188-190, 192-194). Speziell in der Therapie von Tumorpatienten kann es zudem schwierig zu erörtern sein, ob für einzelne Nebenwirkungen entweder die ketogene Diät, die Radio- bzw. Chemotherapie, oder die Krebserkrankung selbst ursächlich sind. Der Großteil der Arbeiten kommt jedoch zu dem Schluss, dass die unerwünschten Wirkungen in der Regel tolerierbar und wenig ausgeprägt waren (5, 29, 187, 196, 197), nach den ersten Tagen sistierten (186), oder gut behandelbar waren (198). Eng verknüpft mit erwünschten und unerwünschten Wirkungen ist die Patientencompliance. Nur wenn sich erwünschte Effekte einstellen und die Nebenwirkungen tolerierbar sind, halten Patienten die doch recht anspruchsvolle Diät durch. Erickson et. al. (172) errechneten in ihrem Review, in das 500 Arbeiten zwischen 1980 und 2016 eingingen, eine Durchhaltequote von 37 % bei Krebspatienten. Die Compliance einer medizinischen Intervention unterliegt allerdings zahlreichen Einflussfaktoren, allen voran der Betreuung während der Behandlung. In einigen der untersuchten Arbeiten erhielten die Patienten jedoch nur minimale Unterstützung oder bekamen Broschüren als Anleitung für die Diät ausgehändigt. So ist es gut vorstellbar, dass die Compliance sowie die Durchhaltequoten bei einer ketogenen Diät durch strukturierte Programme mit Diätschulungen, Gruppenveranstaltungen und durchgängig verfügbaren Ansprechpartnern deutlich gesteigert werden könnten.

Schließlich sind all diese Aspekte wie erwünschte Wirkungen, Kachexievermeidung, Nebenwirkungen und Compliance eng miteinander verwoben und werden in der Frage nach der Lebensqualität vereint- einem Gesichtspunkt, der in den meisten klinischen Arbeiten nicht als primäres Studienziel untersucht wurde (122). Dennoch ist die Verbesserung der Lebensqualität in der Behandlung von Tumorpatienten eines der obersten Ziele. Die kürzlich abgeschlossene KOLIBRI-Studie (NCT02092753) prüft eben diesen

Aspekt einer ketogenen Diät und lässt auf aufschlussreiche Ergebnisse hoffen. Auch Klement (122) evaluiert in seinem Review die Einflüsse einer ketogenen Diät auf die Lebensqualität und findet in der Hälfte der Fälle (12 von 24) eine Verbesserung und nur in einem Fall eine Verschlechterung. Die Einschätzung der Lebensqualität ist zweifellos ein sehr subjektives Thema und kann durch zahlreiche, von der ketogenen Diät unabhängige Faktoren beeinflusst werden. Dennoch markiert dieses Ergebnis einen Schritt in die richtige Richtung und stimmt zuversichtlich in Bezug auf weiteren Nutzen aus diätischen Interventionen. Die ketogene Diät ist also dem Prinzip „primum nil nocere“ folgend nach derzeitigem Wissensstand und basierend auf den selbst erhobenen Daten als unbedenklich anzusehen.

## **5. Zusammenfassung**

Die Zusammenschau unserer experimentellen Ergebnisse und der aktuellen klinischen Studienlage lässt die Aussage zu, dass eine physiologische 3-OHB-Konzentration, wie sie bei einer ketogenen Diät oder Fasten auftritt, eine sichere und nebenwirkungsarme Option zur unterstützenden Behandlung im Rahmen von Brustkrebs darstellt. Während eine wachstumshemmende Wirkung auf Brustkrebs *in vitro* sowohl *per se*, als auch in Kombination mit Radio- oder Chemotherapie nicht nachweisbar war, bleibt der Effekt *in vivo* fraglich. Dennoch können Patienten von einer Erhöhung des 3-OHB-Spiegels im Rahmen einer ketogenen Diät im supportiven Sinne profitieren, ihre Lebensqualität verbessern und müssen keine protumorösen Effekte durch die Ernährungsumstellung fürchten.

Teile dieser Arbeit wurden vorpubliziert in:

Bartmann C, Janaki Raman SR, Floter J, Schulze A, Bahlke K, Willingstorfer J, et al. Beta-hydroxybutyrate (3-OHB) can influence the energetic phenotype of breast cancer cells, but does not impact their proliferation and the response to chemotherapy or radiation. *Cancer Metab.* 2018;6:8.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Koch-Institut R, e.V. GdeKiD. Krebs in Deutschland 2015/2016. 2019.
2. Ferrucci LM, Cartmel B, Turkman YE, Murphy ME, Smith T, Stein KD, et al. Causal attribution among cancer survivors of the 10 most common cancers. *J Psychosoc Oncol.* 2011;29(2):121-40.
3. Maskarinec G, Murphy S, Shumay DM, Kakai H. Dietary changes among cancer survivors. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2001;10(1):12-20.
4. Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol.* 1996;23(1 Suppl 2):89-97.
5. Schmidt M, Pfetzer N, Schwab M, Strauss I, Kammerer 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.
6. Kreienberg R, Möbus V, Jonat W, Kühn T. Mammakarzinom: Interdisziplinär: Springer-Verlag; 2011. p.85.
7. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
8. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-74.
9. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-23.

10. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St. Gallen/Vienna 2017: A Brief Summary of the Consensus Discussion about Escalation and De-Escalation of Primary Breast Cancer Treatment. *Breast Care (Basel)*. 2017;12(2):102-7.
11. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, 2020, AWMF Registernummer: 032-045OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am 07.07.2020).
12. Bauerfeind I, München T. Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: W. Zuckschwerdt Verlag; 2017. p.4.
13. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006;10(6):515-27.
14. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepak T, Costello D, Crowley P, et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)*. 2010;4:35-41.
15. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):215.
16. Bartmann C, Janaki Raman SR, Floter J, Schulze A, Bahlke K, Willingstorfer J, et al. Beta-hydroxybutyrate (3-OHB) can influence the energetic phenotype of breast cancer cells, but does not impact their proliferation and the response to chemotherapy or radiation. *Cancer Metab*. 2018;6:8.
17. Baenke F, Dubuis S, Brault C, Weigelt B, Dankworth B, Griffiths B, et al. Functional screening identifies MCT4 as a key regulator of breast cancer cell metabolism and survival. *J Pathol*. 2015;237(2):152-65.

18. Smith SE, Mellor P, Ward AK, Kendall S, McDonald M, Vizeacoumar FS, et al. Molecular characterization of breast cancer cell lines through multiple omic approaches. *Breast Cancer Res.* 2017;19(1):65.
19. Catalogue of somatic mutations in cancer (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) (abgerufen am: 07.07.2020)
20. Akt Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier; 2009. p. 808-10.
21. Lüllmann H, Mohr K, Hein L. Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen-Medikamente gezielt einsetzen; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker; 130 Tabellen: Georg Thieme Verlag; 2010. p.464.
22. Graefe K, Bönisch H, Lutz W. Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie. 2011: Stuttgart: Thieme. p.666-671.
23. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p.183-190, 254-256, 267-268, 466-473.
24. Racker E. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem.* 1974;5(1-2):17-23.
25. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, et al. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;170(1):223-30.
26. Younes M, Brown RW, Mody DR, Fernandez L, Laucirica R. GLUT1 expression in human breast carcinoma: correlation with known prognostic markers. *Anticancer Res.* 1995;15(6B):2895-8.
27. Medina RA, Owen GI. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res.* 2002;35(1):9-26.

28. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol.* 2005;202(3):654-62.
29. Fine EJ, Segal-Isaacson CJ, Feinman RD, Herszkopf S, Romano MC, Tomuta N, et al. Targeting insulin inhibition as a metabolic therapy in advanced cancer: a pilot safety and feasibility dietary trial in 10 patients. *Nutrition.* 2012;28(10):1028-35.
30. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res.* 2006;66(2):632-7.
31. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Sivridis E. Lung cancer: a comparative study of metabolism related protein expression in cancer cells and tumor associated stroma. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(9):1476-9.
32. Froberg MK, Gerhart DZ, Enerson BE, Manivel C, Guzman-Paz M, Seacotte N, et al. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues. *Neuroreport.* 2001;12(4):761-5.
33. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(1):12-6.
34. Schroeder U, Himpe B, Pries R, Vonthein R, Nitsch S, Wollenberg B. Decline of lactate in tumor tissue after ketogenic diet: in vivo microdialysis study in patients with head and neck cancer. *Nutr Cancer.* 2013;65(6):843-9.
35. Hennipman A, Smits J, van Oirschot B, van Houwelingen JC, Rijksen G, Neyt JP, et al. Glycolytic enzymes in breast cancer, benign breast disease and normal breast tissue. *Tumour Biol.* 1987;8(5):251-63.
36. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(1):17-24.

37. Ibsen KH, Orlando RA, Garratt KN, Hernandez AM, Giorlando S, Nungaray G. Expression of multimolecular forms of pyruvate kinase in normal, benign, and malignant human breast tissue. *Cancer Res.* 1982;42(3):888-92.
38. Balinsky D, Platz CE, Lewis JW. Enzyme activities in normal, dysplastic, and cancerous human breast tissues. *J Natl Cancer Inst.* 1984;72(2):217-24.
39. Altenberg B, Greulich KO. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics.* 2004;84(6):1014-20.
40. Bos R, van Der Hoeven JJ, van Der Wall E, van Der Groep P, van Diest PJ, Comans EF, et al. Biologic correlates of (18)fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography. *J Clin Oncol.* 2002;20(2):379-87.
41. Kunkel M, Reichert TE, Benz P, Lehr HA, Jeong JH, Wieand S, et al. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2003;97(4):1015-24.
42. Yu M, Chen S, Hong W, Gu Y, Huang B, Lin Y, et al. Prognostic role of glycolysis for cancer outcome: evidence from 86 studies. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(4):967-99.
43. Mochiki E, Kuwano H, Kato H, Asao T, Oriuchi N, Endo K. Evaluation of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography for gastric cancer. *World J Surg.* 2004;28(3):247-53.
44. Seyfried TN, Flores RE, Poff AM, D'Agostino DP. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis.* 2014;35(3):515-27.
45. Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer.* 2002;1:9.

46. Aykin-Burns N, Ahmad IM, Zhu Y, Oberley LW, Spitz DR. Increased levels of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem J.* 2009;418(1):29-37.
47. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:441-64.
48. Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med.* 2008;49 Suppl 2:24S-42S.
49. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfor K, Rofstad EK, et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* 2000;60(4):916-21.
50. Gatenby RA, Gawlinski ET. A reaction-diffusion model of cancer invasion. *Cancer Res.* 1996;56(24):5745-53.
51. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood.* 2007;109(9):3812-9.
52. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood.* 2006;107(5):2013-21.
53. Klement R, Kaemmerer U. Can a Low Carbohydrate/ketogenic Diet Retard Tumor Growth? *AKTUELLE ERNAHRUNGSMEDIZIN.* 2016;41(2):95-102.
54. Stattin P, Bjor O, Ferrari P, Lukanova A, Lenner P, Lindahl B, et al. Prospective study of hyperglycemia and cancer risk. *Diabetes Care.* 2007;30(3):561-7.

55. Suh S, Kim KW. Diabetes and cancer: is diabetes causally related to cancer? *Diabetes Metab J*. 2011;35(3):193-8.
56. Jee SH, Ohrr H, Sull JW, Yun JE, Ji M, Samet JM. Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women. *JAMA*. 2005;293(2):194-202.
57. Duan W, Shen X, Lei J, Xu Q, Yu Y, Li R, et al. Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression. *Biomed Res Int*. 2014;2014:461917.
58. Derr RL, Ye X, Islas MU, Desideri S, Saudek CD, Grossman SA. Association between hyperglycemia and survival in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(7):1082-6.
59. Villarreal-Garza C, Shaw-Dulin R, Lara-Medina F, Bacon L, Rivera D, Urzua L, et al. Impact of diabetes and hyperglycemia on survival in advanced breast cancer patients. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:732027.
60. Tieu MT, Lovblom LE, McNamara MG, Mason W, Laperriere N, Millar BA, et al. Impact of glycemia on survival of glioblastoma patients treated with radiation and temozolomide. *J Neurooncol*. 2015;124(1):119-26.
61. Ryu TY, Park J, Scherer PE. Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes Metab J*. 2014;38(5):330-6.
62. Minicozzi P, Berrino F, Sebastiani F, Falcini F, Vattiato R, Cioccoloni F, et al. High fasting blood glucose and obesity significantly and independently increase risk of breast cancer death in hormone receptor-positive disease. *Eur J Cancer*. 2013;49(18):3881-8.
63. Cui G, Zhang T, Ren F, Feng WM, Yao Y, Cui J, et al. High Blood Glucose Levels Correlate with Tumor Malignancy in Colorectal Cancer Patients. *Med Sci Monit*. 2015;21:3825-33.

64. Mayer A, Vaupel P, Struss HG, Giese A, Stockinger M, Schmidberger H. Strong adverse prognostic impact of hyperglycemic episodes during adjuvant chemoradiotherapy of glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol.* 2014;190(10):933-8.
65. Vigneri R, Goldfine ID, Frittitta L. Insulin, insulin receptors, and cancer. *J Endocrinol Invest.* 2016;39(12):1365-76.
66. Gunter MJ, Hoover DR, Yu H, Wassertheil-Smoller S, Rohan TE, Manson JE, et al. Insulin, insulin-like growth factor-I, and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(1):48-60.
67. Klement RJ, Fink MK. Dietary and pharmacological modification of the insulin/IGF-1 system: exploiting the full repertoire against cancer. *Oncogenesis.* 2016;5:e193.
68. Fine EJ, Feinman RD. Insulin, carbohydrate restriction, metabolic syndrome and cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2015;10(1):15-24.
69. McDaniel SS, Rensing NR, Thio LL, Yamada KA, Wong M. The ketogenic diet inhibits the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Epilepsia.* 2011;52(3):e7-11.
70. Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med.* 2016;48(7):e245.
71. Meynet O, Ricci JE. Caloric restriction and cancer: molecular mechanisms and clinical implications. *Trends Mol Med.* 2014;20(8):419-27.
72. Jiang W, Zhu Z, Thompson HJ. Dietary energy restriction modulates the activity of AMP-activated protein kinase, Akt, and mammalian target of rapamycin in mammary carcinomas, mammary gland, and liver. *Cancer Res.* 2008;68(13):5492-9.
73. Klement RJ, Kammerer U. Is there a role for carbohydrate restriction in the treatment and prevention of cancer? *Nutr Metab (Lond).* 2011;8:75.

74. Lundholm K, Holm G, Schersten T. Insulin resistance in patients with cancer. *Cancer Res.* 1978;38(12):4665-70.
75. Poretsky L, Kalin MF. The gonadotropic function of insulin. *Endocr Rev.* 1987;8(2):132-41.
76. Pugeat M, Crave JC, Elmidani M, Nicolas MH, Garoscio-Cholet M, Lejeune H, et al. Pathophysiology of sex hormone binding globulin (SHBG): relation to insulin. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991;40(4-6):841-9.
77. Plymate SR, Matej LA, Jones RE, Friedl KE. Inhibition of sex hormone-binding globulin production in the human hepatoma (Hep G2) cell line by insulin and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67(3):460-4.
78. Pasquali R, Casimirri F, De lasio R, Mesini P, Boschi S, Chierici R, et al. Insulin regulates testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations in adult normal weight and obese men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(2):654-8.
79. Daka B, Rosen T, Jansson PA, Rastam L, Larsson CA, Lindblad U. Inverse association between serum insulin and sex hormone-binding globulin in a population survey in Sweden. *Endocr Connect.* 2013;2(1):18-22.
80. Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Hockel M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O<sub>2</sub> tension measurements. *Cancer Res.* 1991;51(12):3316-22.
81. Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem.* 2009;107(6):1053-62.
82. Henze AT, Garvalov BK, Seidel S, Cuesta AM, Ritter M, Filatova A, et al. Loss of PHD3 allows tumours to overcome hypoxic growth inhibition and sustain proliferation through EGFR. *Nat Commun.* 2014;5:5582.
83. Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:7.

84. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006;3(3):177-85.
85. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006;3(3):187-97.
86. Sattler UG, Mueller-Klieser W. The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis. *Int J Radiat Biol.* 2009;85(11):963-71.
87. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.* 1996;379(6560):88-91.
88. Gatenby RA, Smallbone K, Maini PK, Rose F, Averill J, Nagle RB, et al. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer.* 2007;97(5):646-53.
89. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4(11):891-9.
90. Newman JC, Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(1):42-52.
91. Rojas-Morales P, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. beta-Hydroxybutyrate: A signaling metabolite in starvation response? *Cell Signal.* 2016;28(8):917-23.
92. Klement RJ. Fasting, Fats, and Physics: Combining Ketogenic and Radiation Therapy against Cancer. *Complement Med Res.* 2018;25(2):102-13.
93. Klement RJ, Champ CE, Otto C, Kammerer U. Anti-Tumor Effects of Ketogenic Diets in Mice: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(5):e0155050.

94. Branco AF, Ferreira A, Simoes RF, Magalhaes-Novais S, Zehowski C, Cope E, et al. Ketogenic diets: from cancer to mitochondrial diseases and beyond. *Eur J Clin Invest.* 2016;46(3):285-98.
95. Allen BG, Bhatia SK, Anderson CM, Eichenberger-Gilmore JM, Sibenaller ZA, Mapuskar KA, et al. Ketogenic diets as an adjuvant cancer therapy: History and potential mechanism. *Redox Biol.* 2014;2:963-70.
96. <http://www.charlifoundation.com> (abgerufen am 07.07.2020).
97. Neuropädiatrie LdGfr. Ketogene Diäten.  
[https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/022-021l\\_S1\\_Ketogene\\_Diäten\\_2014-04\\_abgelaufen.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/022-021l_S1_Ketogene_Diäten_2014-04_abgelaufen.pdf) (abgerufen am 07.07.2020).
98. Paoli A, Grimaldi K, Toniolo L, Canato M, Bianco A, Fratter A. Nutrition and acne: therapeutic potential of ketogenic diets. *Skin Pharmacol Physiol.* 2012;25(3):111-7.
99. 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):202-8.
100. Kämmerer U, Johannes Klement R. Möglichkeiten und Grenzen der ketogenen Ernährung in der Krebstherapie. *ZsfOrthomolMed.* 2017;15(02):20-4.
101. Kennedy AR, Pissios P, Otu H, Roberson R, Xue B, Asakura K, et al. A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(6):E1724-39.
102. Klein S, Wolfe RR. Carbohydrate restriction regulates the adaptive response to fasting. *Am J Physiol.* 1992;262(5 Pt 1):E631-6.
103. Otto C, Kaemmerer U, Illert B, Muehling B, Pfetzer N, Wittig R, et al. 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.

104. Champ CE, Palmer JD, Volek JS, Werner-Wasik M, Andrews DW, Evans JJ, et al. Targeting metabolism with a ketogenic diet during the treatment of glioblastoma multiforme. J Neurooncol. 2014;117(1):125-31.

105. Sremanakova J, Sowerbutts AM, Burden S. A systematic review of the use of ketogenic diets in adult patients with cancer. J Hum Nutr Diet. 2018;31(6):793-802.

106. Paoli A, Bosco G, Camporesi EM, Mangar D. Ketosis, ketogenic diet and food intake control: a complex relationship. Front Psychol. 2015;6:27.

107. Cahill GF, Jr. Fuel metabolism in starvation. Annu Rev Nutr. 2006;26:1-22.

108. Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 1999;15(6):412-26.

109. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L, Held A, Maxam G, et al. Stryer Biochemie: Springer Berlin Heidelberg; 2017. p.773-776.

110. 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):309-19.

111. Cahill GF, Jr., Veech RL. Ketoacids? Good medicine? Trans Am Clin Climatol Assoc. 2003;114:149-61; discussion 62-3.

112. Otto C, Klingelhöffer C, Biggemann L, Melkus G, Mörchel P, Jürgens C, et al. Experimentelle Untersuchungen zur Verstoffwechslung von Ketonkörpern und Laktat durch Tumorzellen des Gastrointestinaltrakts. Aktuelle Ernährungsmedizin. 2014;39(01):51-9.

113. Chang HT, Olson LK, Schwartz KA. Ketolytic and glycolytic enzymatic expression profiles in malignant gliomas: implication for ketogenic diet therapy. *Nutr Metab (Lond)*. 2013;10(1):47.
114. Zhang J, Li H. Heterogeneity of tumor chemosensitivity in ovarian epithelial cancer revealed using the adenosine triphosphate-tumor chemosensitivity assay. *Oncol Lett*. 2015;9(5):2374-80.
115. Kimura I, Inoue D, Maeda T, Hara T, Ichimura A, Miyauchi S, et al. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(19):8030-5.
116. Taggart AK, Kero J, Gan X, Cai TQ, Cheng K, Ippolito M, et al. (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem*. 2005;280(29):26649-52.
117. Rahman M, Muhammad S, Khan MA, Chen H, Ridder DA, Muller-Fielitz H, et al. The beta-hydroxybutyrate receptor HCA2 activates a neuroprotective subset of macrophages. *Nat Commun*. 2014;5:3944.
118. Youm YH, Nguyen KY, Grant RW, Goldberg EL, Bodogai M, Kim D, et al. The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med*. 2015;21(3):263-9.
119. Fu SP, Li SN, Wang JF, Li Y, Xie SS, Xue WJ, et al. BHBA suppresses LPS-induced inflammation in BV-2 cells by inhibiting NF-kappaB activation. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:983401.
120. Veech RL, Chance B, Kashiwaya Y, Lardy HA, Cahill GF, Jr. Ketone bodies, potential therapeutic uses. *IUBMB Life*. 2001;51(4):241-7.
121. Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, et al. Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*. 2013;339(6116):211-4.

122. Klement RJ. Beneficial effects of ketogenic diets for cancer patients: a realist review with focus on evidence and confirmation. *Med Oncol.* 2017;34(8):132.
123. Kurbacher CM, Mallmann P, Kurbacher JA, Hubner H, Krebs D. - Chemosensitivity testing in gynecologic oncology. Experiences with an ATP bioluminescence assay. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1996;56(2):70-8.
124. Metzger R, Deglmann CJ, Hoerrlein S, Zapf S, Hilfrich J. Towards in-vitro prediction of an in-vivo cytostatic response of human tumor cells with a fast chemosensitivity assay. *Toxicology.* 2001;166(1-2):97-108.
125. Konecny G, Fritz M, Untch M, Lebeau A, Felber M, Lude S, et al. HER-2/neu overexpression and in vitro chemosensitivity to CMF and FEC in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;69(1):53-63.
126. Shukla SK, Gebregiworgis T, Purohit V, Chaika NV, Gunda V, Radhakrishnan P, et al. Metabolic reprogramming induced by ketone bodies diminishes pancreatic cancer cachexia. *Cancer Metab.* 2014;2:18.
127. Skinner R, Trujillo A, Ma X, Beierle EA. Ketone bodies inhibit the viability of human neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg.* 2009;44(1):212-6; discussion 6.
128. Poff AM, Ari C, Arnold P, Seyfried TN, D'Agostino DP. Ketone supplementation decreases tumor cell viability and prolongs survival of mice with metastatic cancer. *Int J Cancer.* 2014;135(7):1711-20.
129. 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):529-39.
130. Kadochi Y, Mori S, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Nishiguchi Y, Kishi S, et al. Remodeling of energy metabolism by a ketone body and medium-chain fatty acid suppressed the proliferation of CT26 mouse colon cancer cells. *Oncol Lett.* 2017;14(1):673-80.

131. Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell Cycle*. 2012;11(21):3964-71.
132. Kim DY, Rho JM. The ketogenic diet and epilepsy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008;11(2):113-20.
133. Maurer GD, Brucker DP, Bahr O, Harter PN, Hattingen E, Walenta S, et al. Differential utilization of ketone bodies by neurons and glioma cell lines: a rationale for ketogenic diet as experimental glioma therapy. *BMC Cancer*. 2011;11:315.
134. Zhou W, Mukherjee P, Kiebish MA, Markis WT, Mantis JG, Seyfried TN. The calorically restricted ketogenic diet, an effective alternative therapy for malignant brain cancer. *Nutr Metab (Lond)*. 2007;4:5.
135. Stafford P, Abdelwahab MG, Kim DY, Preul MC, Rho JM, Scheck AC. The ketogenic diet reverses gene expression patterns and reduces reactive oxygen species levels when used as an adjuvant therapy for glioma. *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7:74.
136. Nakamura K, Tonouchi H, Sasayama A, Ashida K. A Ketogenic Formula Prevents Tumor Progression and Cancer Cachexia by Attenuating Systemic Inflammation in Colon 26 Tumor-Bearing Mice. *Nutrients*. 2018;10(2).
137. Freedland SJ, Mavropoulos J, Wang A, Darshan M, Demark-Wahnefried W, Aronson WJ, et al. Carbohydrate restriction, prostate cancer growth, and the insulin-like growth factor axis. *Prostate*. 2008;68(1):11-9.
138. Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, et al. Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle*. 2010;9(17):3506-14.
139. Rodrigues LM, Uribe-Lewis S, Madhu B, Honess DJ, Stubbs M, Griffiths JR. The action of beta-hydroxybutyrate on the growth, metabolism and global

histone H3 acetylation of spontaneous mouse mammary tumours: evidence of a beta-hydroxybutyrate paradox. *Cancer Metab.* 2017;5:4.

140. Chappell J, Leitner JW, Solomon S, Golovchenko I, Goalstone ML, Draznin B. Effect of insulin on cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells. Direct and potentiating influence. *J Biol Chem.* 2001;276(41):38023-8.

141. Jiang YS, Wang FR. Caloric restriction reduces edema and prolongs survival in a mouse glioma model. *J Neurooncol.* 2013;114(1):25-32.

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

143. Rieger J, Bahr O, Maurer GD, Hattingen E, Franz K, Brucker D, et al. ERGO: a pilot study of ketogenic diet in recurrent glioblastoma. *Int J Oncol.* 2014;44(6):1843-52.

144. 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.

145. Chu-Shore CJ, Thiele EA. Tumor growth in patients with tuberous sclerosis complex on the ketogenic diet. *Brain Dev.* 2010;32(4):318-22.

146. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(8):427-33.

147. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(49):19345-50.

148. Allen BG, Bhatia SK, Buatti JM, Brandt KE, Lindholm KE, Button AM, et al. Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemo-therapy responses in lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res.* 2013;19(14):3905-13.
149. Zahra A, Fath MA, Opat E, Mapuskar KA, Bhatia SK, Ma DC, et al. Consuming a Ketogenic Diet while Receiving Radiation and Chemotherapy for Locally Advanced Lung Cancer and Pancreatic Cancer: The University of Iowa Experience of Two Phase 1 Clinical Trials. *Radiat Res.* 2017;187(6):743-54.
150. Saleh AD, Simone BA, Palazzo J, Savage JE, Sano Y, Dan T, et al. Caloric restriction augments radiation efficacy in breast cancer. *Cell Cycle.* 2013;12(12):1955-63.
151. Safdie F, Brandhorst S, Wei M, Wang W, Lee C, Hwang S, et al. Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy. *PLoS One.* 2012;7(9):e44603.
152. Rossi AP, Woolf EC, Brooks KS, Fairres MJ, Scheck AC. The ketone body  $\beta$ -hydroxybutyrate increases radiosensitivity in glioma cell lines in vitro. *AACR*; 2015.
153. Abdelwahab MG, Fenton KE, Preul MC, Rho JM, Lynch A, Stafford P, et al. The ketogenic diet is an effective adjuvant to radiation therapy for the treatment of malignant glioma. *PLoS One.* 2012;7(5):e36197.
154. Simone BA, Dan T, Palagani A, Jin L, Han SY, Wright C, et al. Caloric restriction coupled with radiation decreases metastatic burden in triple negative breast cancer. *Cell Cycle.* 2016;15(17):2265-74.
155. Klement RJ. The influence of ketogenic therapy on the 5 R's of radiobiology. *Int J Radiat Biol.* 2017:1-13.
156. Lopez-Rios F, Sanchez-Arago M, Garcia-Garcia E, Ortega AD, Berrendero JR, Pozo-Rodriguez F, et al. Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res.* 2007;67(19):9013-7.

157. Sullivan PG, Rippey NA, Dorenbos K, Concepcion RC, Agarwal AK, Rho JM. The ketogenic diet increases mitochondrial uncoupling protein levels and activity. *Ann Neurol.* 2004;55(4):576-80.
158. Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther.* 2004;3(4):294-300.
159. Hadzic T, Aykin-Burns N, Zhu Y, Coleman MC, Leick K, Jacobson GM, et al. Paclitaxel combined with inhibitors of glucose and hydroperoxide metabolism enhances breast cancer cell killing via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(8):1024-33.
160. Aminzadeh-Gohari S, Feichtinger RG, Vidali S, Locker F, Rutherford T, O'Donnell M, et al. A ketogenic diet supplemented with medium-chain triglycerides enhances the anti-tumor and anti-angiogenic efficacy of chemotherapy on neuroblastoma xenografts in a CD1-nu mouse model. *Oncotarget.* 2017;8(39):64728-44.
161. Pietrocola F, Pol J, Vacchelli E, Rao S, Enot DP, Baracco EE, et al. Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. *Cancer Cell.* 2016;30(1):147-60.
162. Lee C, Raffaghello L, Brandhorst S, Safdie FM, Bianchi G, Martin-Montalvo A, et al. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Sci Transl Med.* 2012;4(124):124ra27.
163. D'Aronzo M, Vinciguerra M, Mazza T, Panebianco C, Saracino C, Pereira SP, et al. Fasting cycles potentiate the efficacy of gemcitabine treatment in in vitro and in vivo pancreatic cancer models. *Oncotarget.* 2015;6(21):18545-57.
164. Bianchi G, Martella R, Ravera S, Marini C, Capitanio S, Orengo A, et al. Fasting induces anti-Warburg effect that increases respiration but reduces ATP-synthesis to promote apoptosis in colon cancer models. *Oncotarget.* 2015;6(14):11806-19.

165. Morscher RJ, Aminzadeh-Gohari S, Hauser-Kronberger C, Feichtinger RG, Sperl W, Kofler B. Combination of metronomic cyclophosphamide and dietary intervention inhibits neuroblastoma growth in a CD1-nu mouse model. *Oncotarget*. 2016;7(13):17060-73.
166. Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, et al. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(24):8215-20.
167. Huisman SA, de Bruijn P, Ghobadi Moghaddam-Helmantel IM, JN IJ, Wiemer EA, Mathijssen RH, et al. Fasting protects against the side effects of irinotecan treatment but does not affect anti-tumour activity in mice. *Br J Pharmacol*. 2016;173(5):804-14.
168. Chandrasekera PC, Pippin JJ. Of rodents and men: species-specific glucose regulation and type 2 diabetes research. *ALTEX*. 2014;31(2):157-76.
169. de Groot S, Vreeswijk MP, Welters MJ, Gravesteijn G, Boei JJ, Jochems A, et al. The effects of short-term fasting on tolerance to (neo) adjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients: a randomized pilot study. *BMC Cancer*. 2015;15:652.
170. Dorff TB, Groshen S, Garcia A, Shah M, Tsao-Wei D, Pham H, et al. Safety and feasibility of fasting in combination with platinum-based chemotherapy. *BMC Cancer*. 2016;16:360.
171. Iyikesici MS, Slocum AK, Slocum A, Berkarda FB, Kalamian M, Seyfried TN. Efficacy of Metabolically Supported Chemotherapy Combined with Ketogenic Diet, Hyperthermia, and Hyperbaric Oxygen Therapy for Stage IV Triple-Negative Breast Cancer. *Cureus*. 2017;9(7):e1445.
172. Erickson N, Boscheri A, Linke B, Huebner J. Systematic review: isocaloric ketogenic dietary regimes for cancer patients. *Med Oncol*. 2017;34(5):72.

173. Weber DD, Aminazdeh-Gohari S, Kofler B. Ketogenic diet in cancer therapy. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(2):164-5.
174. Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, Nakamura N, Inui A. Cancer cachexia--pathophysiology and management. *J Gastroenterol*. 2013;48(5):574-94.
175. Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin*. 2002;52(2):72-91.
176. Tohgo A, Kumazawa E, Akahane K, Asakawa A, Inui A. Anticancer drugs that induce cancer-associated cachectic syndromes. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2002;2(1):121-9.
177. Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(11):862-71.
178. Holm E, Kämmerer U. Fette und Kohlenhydrate in Ernährungskonzepten für Tumorpatienten. *Aktuelle Ernährungsmedizin*. 2011;36(05):286-98.
179. Beck SA, Tisdale MJ. Nitrogen excretion in cancer cachexia and its modification by a high fat diet in mice. *Cancer Res*. 1989;49(14):3800-4.
180. Beck SA, Tisdale MJ. Effect of insulin on weight loss and tumour growth in a cachexia model. *Br J Cancer*. 1989;59(5):677-81.
181. 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.
182. Klement RJ, Schaefer G, Sweeney RA. Impact of a ketogenic diet intervention during radiotherapy on body composition: III. An interim analysis of the KETOCOMP study. *bioRxiv*. 2018:343251.
183. Dhamija R, Eckert S, Wirrell E. Ketogenic diet. *Can J Neurol Sci*. 2013;40(2):158-67.

184. Martin K, Jackson CF, Levy RG, Cooper PN. Ketogenic diet and other dietary treatments for epilepsy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2:CD001903.
185. Mosek A, Natour H, Neufeld MY, Shiff Y, Vaisman N. Ketogenic diet treatment in adults with refractory epilepsy: a prospective pilot study. *Seizure*. 2009;18(1):30-3.
186. Urbain P, Strom L, Morawski L, Wehrle A, Deibert P, Bertz H. Impact of a 6-week non-energy-restricted ketogenic diet on physical fitness, body composition and biochemical parameters in healthy adults. *Nutr Metab (Lond)*. 2017;14:17.
187. Liu H, Yang Y, Wang Y, Tang H, Zhang F, Zhang Y, et al. Ketogenic diet for treatment of intractable epilepsy in adults: A meta-analysis of observational studies. *Epilepsia Open*. 2018;3(1):9-17.
188. Yancy WS, Jr., Olsen MK, Guyton JR, Bakst RP, Westman EC. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 2004;140(10):769-77.
189. Yancy WS, Jr., Westman EC, McDuffie JR, Grambow SC, Jeffreys AS, Bolton J, et al. A randomized trial of a low-carbohydrate diet vs orlistat plus a low-fat diet for weight loss. *Arch Intern Med*. 2010;170(2):136-45.
190. Volek JS, Phinney SD, Forsythe CE, Quann EE, Wood RJ, Puglisi MJ, et al. Carbohydrate restriction has a more favorable impact on the metabolic syndrome than a low fat diet. *Lipids*. 2009;44(4):297-309.
191. Sharman MJ, Kraemer WJ, Love DM, Avery NG, Gomez AL, Scheett TP, et al. A ketogenic diet favorably affects serum biomarkers for cardiovascular disease in normal-weight men. *J Nutr*. 2002;132(7):1879-85.

192. Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, et al. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med*. 2008;359(3):229-41.
193. Gardner CD, Kiazand A, Alhassan S, Kim S, Stafford RS, Balise RR, et al. Comparison of the Atkins, Zone, Ornish, and LEARN diets for change in weight and related risk factors among overweight premenopausal women: the A TO Z Weight Loss Study: a randomized trial. *JAMA*. 2007;297(9):969-77.
194. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, Makris AP, Rosenbaum DL, Brill C, et al. Weight and metabolic outcomes after 2 years on a low-carbohydrate versus low-fat diet: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2010;153(3):147-57.
195. Volek JS, Fernandez ML, Feinman RD, Phinney SD. Dietary carbohydrate restriction induces a unique metabolic state positively affecting atherogenic dyslipidemia, fatty acid partitioning, and metabolic syndrome. *Prog Lipid Res*. 2008;47(5):307-18.
196. Schwartz K, Chang HT, Nikolai M, Pernicone J, Rhee S, Olson K, et al. Treatment of glioma patients with ketogenic diets: report of two cases treated with an IRB-approved energy-restricted ketogenic diet protocol and review of the literature. *Cancer Metab*. 2015;3:3.
197. Chung HY, Park YK. Rationale, Feasibility and Acceptability of Ketogenic Diet for Cancer Treatment. *J Cancer Prev*. 2017;22(3):127-34.
198. Hartman AL, Vining EP. Clinical aspects of the ketogenic diet. *Epilepsia*. 2007;48(1):31-42.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stoffwechsel einer gesunden Zelle.....	10
Abbildung 2: Stoffwechsel einer neoplastischen Zelle. ....	11
Abbildung 3: Onkogenkaskade PI3-Akt-mTOR. ....	13
Abbildung 4: Ketonkörper. ....	16
Abbildung 5: Ketonkörperstoffwechsel bei ketogener Diät bzw. Fasten.....	18
Abbildung 6: Regulatorisches Potenzial der ketogenen Diät.....	20
Abbildung 7: Plattenbelegung beim Colony Forming Assay.....	29
Abbildung 8: Plattenbelegung für je eine Zelllinie bei Chemosensitivitätstestungen gegenüber Epirubicin bzw. Paclitaxel.....	30
Abbildung 9: Plattenbelegung bei Chemosensitivitätstestungen gegenüber Carboplatin. ....	30
Abbildung 10: Plattenbelegung für je eine Sauerstoffkondition und Bestrahlungsintensität bei Radiosensitivitätstestungen.....	35
Abbildung 11: Wachstumsverhalten der untersuchten Tumorzelllinien in G5-Medium (Kontrolle) im Vergleich zu ihrem Wachstum in 3 mM 3-OHB bei 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff.....	39
Abbildung 12: Wuchsmuster beim Colony Forming Assay.....	40
Abbildung 13: Durchschnittliche Laktatproduktion sowie Glukoseverbrauch der jeweiligen Zelllinien nach einer Versuchsdauer von 7 Tagen bei jeweils 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff. ....	43
Abbildung 14: Konzentration und Verbrauch von Betahydroxybutyrat. ....	44
Abbildung 15: Veränderungen der Zellzahlen von BT474 nach Bestrahlung mit Dosen von 0, 2, 4, 6 und 8 Gray.....	46
Abbildung 16: Veränderungen der Zellzahlen von MCF-7 nach Bestrahlung mit Dosen von 0, 2, 4, 6 und 8 Gray.....	47
Abbildung 17: Veränderungen der Zellzahlen von T47D nach Bestrahlung mit Dosen von 0, 2, 4, 6 und 8 Gray.....	48
Abbildung 18: Veränderungen der Zellzahlen von BT474 nach chemotherapeutischer Behandlung mit Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin in verschiedenen Dosierungen.....	50

Abbildung 19: Veränderungen der Zellzahlen von MCF-7 nach chemotherapeutischer Behandlung mit Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin in verschiedenen Dosierungen.....	51
Abbildung 20: Veränderungen der Zellzahlen von T47D nach chemotherapeutischer Behandlung mit Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin in verschiedenen Dosierungen.....	52
Abbildung 21: Veränderung der IC 50 von T47D in G5-Medium bzw. 3-OHB- Medium nach chemotherapeutischer Behandlung mit Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin in verschiedenen Dosierungen.....	53
Abbildung 22: Veränderung der IC 50 bei den 3 verwendeten Zytostatika in Kontrollmedium im Vergleich zu mit 3-OHB versetztem Medium.....	54

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Mammakarzinom-Subtypen gemäß der St. Gallen- Klassifikation.....	3
Tabelle 2: Steckbriefe der verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien (13-19). ....	4
Tabelle 3: IC 50 Werte der untersuchten Zelllinien bei 1 %, 5 % und 21 % Umgebungssauerstoff in Kontrollmedium im Vergleich zu mit 3-OHB versetztem Medium.....	55

## Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2DG	2-Desoxy-D-Glukose
3-OHB	Betahydroxybutyrat
ACAT	Acetoacetyl-CoA-Thiolase
ACVR1	Aktivin-A-Rezeptor, Typ I
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Serin/Threonin-Kinase
AMPK	Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase
ARID1A	AT-reiches interaktives Domänen enthaltendes Protein 1A
ATP	Adenosintriphosphat
ATP2B3	Plasmamembran-Calcium- transportierende ATPase 3
BDH	Betahydroxybutyratdehydrogenase
BrdU	Bromodesoxyuridin
bzw.	Beziehungsweise
CFA	Colony Forming Assay
CDKN2A	Zyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
DCIS	Duktales Karzinoma in Situ
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium No Glucose
DNA	Desoxynukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EP300	Histonacetyltransferase P300
EPS15	Epidermales Wachstumsfaktor-Rezeptorsubstrat 15
ER	Östrogenrezeptor
ERBB4 = HER4	Human Epidermal Growth Factor 4
FAD	Flavin-Adenein-Dinukleotid, oxidierte Form
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenein-Dinukleotid, reduzierte Form
FCS	Fetales Kälberserum
FDG-PET-CT	Flour-Desoxy-Glukose-Protonenemmissionstomographie
FFAR3 = GPR41	Freie-Fettsäuren-Rezeptor 3
FFS	Freie Fettsäuren
FOXO3A	Forkhead-Box-Protein 3
G2-Phase	Gap2-Phase des Zellzyklus
G5	5 millimolare Glukoselösung
Ggf.	Gegebenenfalls
GLUT	Glukosetransporter
GPR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GS-SG	Glutathion, oxidierte Form
GSH	Glutathion, reduzierte Form
Gy	Gray
h	Stunde
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCAR2 = GPR109A	Hydroxycarboxylsäurerezeptor 2
HDAC	Histondeacetylasen
HDL	High Density Lipoprotein
HIST1H3B	Histon H 3.1 kodierendes Gen
HER2	Human Epidermal Growth Factor 2
HRP	Meerrettichperoxidase

IC 50	mittlere Hemmkonzentration
IDC	Invasiv Duktales Karzinom
IGF1	Insulin-like-Growth Faktor 1
IGFR	Insulin-like-Growth Faktor- Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
INF- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IR	Insulin-Rezeptor
Ki-67	an Zellzyklusregulation beteiligtes Kernprotein
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LIN	Lobuläre Intraepitheliale Neoplasie
M-Phase	Mitosephase des Zellzyklus
MAP3K13	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 13
MCT	Monocarboxyltransporter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar; =mmol/l
mol	Mol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MV	Megavolt
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidierte Form

NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NLRP3	Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing 3
NSD1	Nukleäres Rezeptor-bindendes SET Domänen Protein 1
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pi	anorganisches Phosphat
PI3	Phosphoinositid 3- Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-Kinase, katalytische Untereinheit alpha
PPAR $\alpha$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\alpha$
PPP2R1A	Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2A regulatorische Untereinheit A alpha isoform
PR	Progesteronrezeptor
RHOA	Ras-Homolog A
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
s.	siehe
SBHG	Sexualhormonbindeglobulin
SCOT	$\beta$ -Ketoacyl-CoA-Transferase
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
STF	Short Term Fasting
TDI	Test Drug Concentration

TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TMB	Tetramethylbenzidin
TP53	Tumorprotein 53
UCP	mitochondriale Entkopplungsproteine
VEGF 1/2	Vaskulärer epithelialer Wachstumsfaktor 1/2
Vgl.	vergleiche
WST-8	Hydrophiles Tetrazolium-Salz [2-(2- methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4- nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl- 2Htetrazolium, monosodium salt ]
$\beta$ -HMG-CoA	$\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-Coenzym A
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

## **Danksagung**

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Achim Wöckel, Direktor der Frauenklinik und Poliklinik am Universitätsklinikum Würzburg, für die Möglichkeit, in seiner Klinik zu promovieren.

Mein besonderer Dank gilt zudem meiner Doktormutter Frau Apl. Prof. Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer, ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre. Durch die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in ihr Labor konnte ich wertvolle Einblicke ins wissenschaftlich-experimentelle Arbeiten gewinnen. Ihr offenes Ohr bei fachlichen Fragen und Problemen sowie ihre konstruktive Kritik weiß ich bis heute zu schätzen.

Ebenso möchte ich herzlich Frau Michaela Kapp danken, auf deren fachliche sowie technische Expertise ich im Labor stets zählen konnte.

Nicht unerwähnt bleiben soll auch Frau Jana Willingstorfer, in deren Gesellschaft ich viele Stunden im Labor verbrachte und die mir in den Höhen und Tiefen des experimentellen Arbeitens zur Freundin wurde.

Von Herzen danke ich außerdem meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung.