

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

***In Vitro* Analyse der Methionin-Restriktion im murinen Modellsystem L929 sowie im
Platteneptihelkarzinom - HNSCC**

Inauguraldissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Corinna Koderer
aus Kempten**

Würzburg, September 2021

Referent bzw. Referentin: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler
Korreferent bzw. Korreferentin: Uni-Prof. Dr. Thomas Müller
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das orale Plattenepithelkarzinom	1
1.1.1	Ätiologie und Epidemiologie	1
1.1.2	Pathogenese und klinisches Bild	2
1.1.3	Therapieformen	3
1.1.4	Prognose von HNSCC	5
1.2	Energie als Therapieansatz – Warburg Effekt	6
1.2.1	Kalorien-Restriktion	8
1.2.2	Aminosäure-/Protein-Restriktion	10
1.2.3	Methionin-Restriktion	11
1.2.4	Molekulare Mechanismen des Low-Energy-Metabolismus	12
1.2.5	Das Potential des Low-Energy-Metabolismus als Therapieansatz gegen Krebs...	17
1.3	Kleiner Exkurs in die Altersforschung	18
1.3.1	Caloric Restriction Mimetics	21
1.4	Ziel der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Zelllinien	25
2.1.2	Zellkulturmedien und Zusätze	25
2.1.3	Reagenzien und Chemikalien	27
2.1.4	Geräte	27
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.6	Lösungen	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Kultivierung der Zelllinien	29
2.2.2	Zellzählung	29
2.2.3	Modifizierter Bradford-Assay nach Grintzalis und Geourgiou	35
2.2.4	WST1-Vitalitäts-Assay	36
2.2.5	Metabolom-Analyse mittels Massenspektrometrie	37
2.2.6	Statistik	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Proliferationsverhalten ausgesuchter Zelllinien unter Aminosäure-Restriktion	44
3.1.1	Proliferationsverhalten unter Methionin-Restriktion über einen Zeitraum von sieben Tagen	45
3.1.2	Proliferationsverhalten unter Methionin-/Cystein-Restriktion über einen Zeitraum von sieben Tagen	47
3.1.3	Analyse der Zellvitalität unter Methionin-Restriktion	50
3.2	L929 als murines Modellsystem der Methionin-Restriktion	56
3.2.1	Proliferationsverhalten der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion über einen Zeitraum von sieben Tagen	57
3.2.2	Proliferationsverhalten der Zelllinie L929 unter Methionin-/Cystein-Restriktion über einen Zeitraum von sieben Tagen	59

3.2.3	Einfluss der Methionin-Restriktion auf die Gesamtproteinmenge der Zelllinie L929 über einen Zeitraum von fünf Tagen	61
3.2.4	Massenspektrometrische Untersuchung des Metabolismus der murinen Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion über einen Zeitraum von fünf Tagen	62
3.2.5	Aminosäure-Analoga als potentielle Caloric Restriction Mimetics	82
4	Diskussion.....	96
4.1	Antiproliferative Wirkung der Methionin-Restriktion in HNSCC-Zelllinien	98
4.2	Cystein-Restriktion als Alternative zur Methionin-Restriktion....	102
4.3	Zelluläre Gesamtproteinmenge unter Methionin-Restriktion.....	104
4.4	Metabolismus unter Methionin-Restriktion.....	106
4.5	Metaboler Fingerabdruck der Methionin-Restriktion	112
4.6	Aminosäure-Analoga als potentielle Therapieoption	113
4.7	Ausblick.....	115
5	Zusammenfassung	119
6	Literatur-/Abbildungs-/Tabellenverzeichnis	120
6.1	Literaturverzeichnis	120
6.2	Abbildungsverzeichnis	129
6.3	Tabellenverzeichnis	131
7	Appendix	
8	Danksagung	
9	Curriculum Vitae	
10	Publikationen	
11	Eidesstattliche Erklärung	

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
A	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BG	Background
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
Boc-L-Met	Boc-L-Methionin
BSA	Bovines Serumalbumin/Rinderalbumin
CBB	Coomassie Brilliant Blau
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CRM	Caloric Restriction Mimetic
Cys	Cystein
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
FBS/FCS	Fetal bovine serum/Fetal calf serum
FGF-21	fibroblast growth factor 21
F _{moc}	Fluorenylmethoxycarbonyl
F _{moc} -L-Met-OH	F _{moc} -L-Methionin
GH	growth hormone, Somatotropin
GTP	Guanosintriphosphat

Abkürzung	Bezeichnung
GSH	Glutahtion
GSSG	Glutahtiondisulfid
HaCaT	Human adult low calcium high temperature keratinocytes
Hcy	Homocystein
Hse	Homoserin
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humanes Papillomavirus
IGF-1	insulin like growth factor 1
L-γ-Azidohomoala-HCl	L-γ-Azidohomoalanin Hydrochlorid
LC/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS)
MEM	Minimum Essential Media
Met	Methionin
MFA	metabolische Flussanalyse
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MW	Mittelwert
N-Formyl-L-Met	N-Formyl-L-Methionin
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
OD	Optical density/optische Dichte
OPP	O-Propargyl-Pyromycin
p53	tumor suppressor p53
PBS	Phosphate-buffered saline
PD-1-Rezeptor	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed death ligand 1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
Rpm	Revolutions per minute/Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAH	S-Adenoysl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STABW	Standardabweichung
WST1	water soluble tetrazolium
Z-DL- β -Homoala-OH	Z-DL- β -Homoalanin

1 Einleitung

1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom (englisch: head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) ist auch bekannt als spinozelluläres Karzinom, Spinaliom, Stachelzellkrebs oder Epithelioma spinocellulare. Die meisten Tumore im Kopf-Hals-Bereich sind solche Plattenepithelkarzinome. Sie umfassen Karzinome des Larynx, des Hypo- und des Oropharynx und vor allem der Mundhöhle, wo sie hauptsächlich am Mundboden und am seitlichen Zungenrand auftreten (Chow, 2020). Es handelt sich dabei um eine maligne, neoplastische Erkrankung, die von den Epithelzellen der Haut oder Schleimhaut ausgeht.

1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie

Das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich ist weltweit der siebthäufigste maligne Tumor (Chow, 2020). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren und HNSCCs sind weltweit die achthäufigste tumorbedingte Todesursache (Ragin *et al.*, 2007). Männer sind deutlich häufiger betroffen als Frauen. Das orale Plattenepithelkarzinom ist das siebthäufigste Karzinom beim Mann und das 15. häufigste bei der Frau (Riede and Weyer, 2017).

Seit langem bekannte Risikofaktoren sind Alkohol- und Tabakabusus. Aber auch eine schlechte Mundhygiene erhöht das Erkrankungsrisiko. Mindestens 75 % der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich sind der Risikogruppe aus der Kombination von Alkohol- und Tabakabusus zuzuschreiben (Curado and Boyle, 2013). Für langjährige Raucher ist das Risiko, ein HNSCC zu entwickeln, 20-fach und unter langjährigem Alkoholabusus fünffach erhöht. Die Kombination aus starkem Rauchen und hohem Alkoholkonsum führt sogar zu einem 50-fach erhöhten Tumorrisiko (Hunter *et al.*, 2005).

Außerdem können auch virale Onkogene wie das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder Humane Papillomviren (HPV) zur Tumorgenese beitragen. EBV, der Erreger des Pfeifferschen Drüsenfiebers, ist ein DNA-Virus und kann vor allem bei schlechter Abwehrlage zu Lymphomen oder Nasopharynxkarzinomen führen. Die Humanen

Papillomviren (HPV), ebenfalls DNA-Viren, sind vor allem im Zusammenhang mit Zervix- und Oropharynxkarzinomen zu sehen. Es gibt über 150 verschiedene HPV-Typen und auch mehrere sogenannte High-Risk-Typen. HPV-Typ 6, 11, 16 und 18 sind diejenigen, die die Zellen in der Mundhöhle und im Pharynx befallen (Ragin *et al.*, 2007). Die Zahl der HPV-positiven Tumore ist in der letzten Zeit gestiegen (Gillison *et al.*, 2015).

Eine geographische Häufung des Auftretens von HNSCCs im südostasiatischen Raum, in Pazifikregionen, in Lateinamerika sowie in Teilen Zentral- und Osteuropas kann beobachtet werden und wird unter anderem mit dem Kauen von Betelnüssen in Verbindung gebracht (Warnakulasuriya, 2009).

Mehrere Studien konnten zeigen, dass auch Ernährungsgewohnheiten das Risiko der Entstehung von oralen HNSCCs beeinflussen. Ein regelmäßiger Obst- und Gemüsekonsum hat einen positiven Einfluss und wirkt protektiv, wohingegen ein hoher Fleischkonsum (vor allem von rotem Fleisch) einen negativen Einfluss hat (Chuang *et al.*, 2012, Pavia *et al.*, 2006).

1.1.2 Pathogenese und klinisches Bild

Eine häufige Vorstufe von Plattenepithelkarzinomen sind Präkanzerosen. Es kann sich hierbei um Schleimhautveränderungen wie zum Beispiel eine Leukoplakie, Erythroplakie oder den Lichen ruber planus handeln, mit denen eine erhöhte Entartungswahrscheinlichkeit einhergeht (van der Waal, 2009). Die Entartung erfolgt von Präkanzerose zu Carcinoma *in situ* mit einer noch intakten Basalmembran. Zu diesem Zeitpunkt ist die Invasion und Infiltration in tiefere Gewebsschichten noch nicht erfolgt, und es handelt sich in der Regel um Tumore in einem noch heilbaren Stadium. Makroskopisch lässt sich im prämaligen Stadium in den meisten Fällen eine flache Leukoplakie erkennen. Im Tumorstadium ist dann das exophytisch-polypöse von dem endophytisch-ulzerierenden Wachstum zu unterscheiden.

Histologisch kann man bei HNSCCs ein invasives Wachstum mit Durchbrechung der Basalmembran beobachten (Riede and Weyer, 2017). Außerdem unterscheidet man histologisch gut-differenzierte (verhornende) und wenig-differenzierte (nicht-verhornende) Karzinome. Je nach Differenzierungsgrad kann das Plattenepithel als Ausgangsgewebe noch gut erkennbar sein und es lassen sich Hornperlen oder Schuppen erkennen. Nicht verhornende, also wenig-differenzierte HNSCCs wachsen schneller und haben eine schlechtere Prognose. Typische histologische Malignitätskriterien sind Zellkernvergrößerung, Zellkernpolymorphie, Zellkernhyperchromasie sowie atypische Mitosen.

Aufgrund der Heterogenität der HNSCCs im Kopf-Hals-Bereich gibt es auch auf molekularer Ebene eine Vielzahl von Genen, Proteinen und Transkriptionsfaktoren, die bei der Entstehung von Tumoren relevant sein können. Es wird angenommen, dass durch Deletion, Punktmutation, Promotormethylierung und Genamplifikation eine Aktivierung von Onkogenen sowie eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erfolgt. Ein Tumorsuppressorgen, welches bei HNSCCs häufig inaktiviert wird, ist p53. Dieses besitzt die Fähigkeit bei vorhandenen DNA-Schäden den Zellzyklus zu unterbrechen, was der Zelle Zeit zur Reparatur verschafft oder bei irreparablen Schäden den programmierten Zelltod/Apoptose einleiten kann. In bis zu 80 % der HNSCCs ist eine p53-Mutation nachweisbar (Hunt *et al.*, 2014, Brandt and Petrides, 2014).

Für die Therapie und Prognose ist entscheidend, ob der Tumor schon Metastasen gebildet hat. Die Metastasierung von oralen Plattenepithelkarzinomen erfolgt meist lymphogen in die regionären Halslymphknoten, seltener auch hämatogen (Riede and Weyer, 2017).

1.1.3 Therapieformen

Um standardisierte Aussagen bezüglich Therapie und Prognose treffen zu können, erfolgt nach Abschluss des Stagings die Klassifikation des Tumors anhand des TNM-Schemas. Es wird die Tumorgöße und Infiltrationstiefe sowie das Vorliegen von lokoregionären Lymphknotenmetastasen und von Fernmetastasen erfasst. T steht dabei für Tumor, N für Nodus (Lymphknoten) und M für Fernmetastase (Ehrenfeld *et al.*, 2011). Abhängig von der TNM-

Einteilung wird im interdisziplinären Tumorboard unter Beteiligung der Fachdisziplinen Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Strahlentherapie, Onkologie, Pathologie und Radiologie über die Therapie entschieden.

Ein grundlegender Unterschied besteht hinsichtlich kurativer und palliativer Therapie. Bei einem palliativen Therapieansatz wird versucht, die Lebensqualität zu verbessern sowie Funktionseinschränkungen und Schmerzen zu minimieren. Zum Beispiel gibt es den Ansatz, durch eine alleinige Radiatio den Tumor zu verkleinern. Eine kurative Therapie dagegen sieht die komplette Entfernung des Tumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand vor sowie, je nach Lokalisation des Primärtumors, eine ipsilaterale oder bilaterale Lymphadenektomie. Eine bewährte Methode zur Defektdeckung stellt die Rekonstruktion mit mikrochirurgisch anastomosierten Transplantaten dar. Abhängig von der Tumorgöße, dem Resektionsstatus, der Perineuralscheideninfiltration, der Gefäßinvasion und des Lymphknotenbefalls wird über eine kombinierte Radiochemotherapie im Anschluss an die Operation entschieden.

Die postoperative Lebensqualität der Tumorpatienten wird durch die chirurgische Tumorentfernung, die Chemotherapie und die Radiotherapie bestimmt. Vernarbtes Gewebe nach chirurgischer Intervention verursacht, wie auch bestrahltes Gewebe, Komplikationen beim Sprechen und Schlucken (Aarstad *et al.*, 2003), aber auch der ästhetische Anspruch wird im Kopf-Hals Bereich nicht außer Acht gelassen.

Als neuere Therapieoption gibt es zusätzlich zur Radio-/Chemotherapie sogenannte Targettherapien. Dabei kommen monoklonale Antikörper, wie zum Beispiel Cetuximab oder Nivolumab, zum Einsatz. Cetuximab ist gegen EGFR (epidermal growth factor receptor) gerichtet. Dies ist ein membranständiger Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. In HNSCC-Zellen ist EGFR in bis zu 90 % der Fälle überexprimiert (Grandis and Tweardy, 1993). Durch Bindung des Antikörpers wird sowohl die Rezeptoraktivierung als auch die nachfolgende Signalkaskade inhibiert. Dies führt sowohl zur Hemmung der Angiogenese als auch zu einer Verminderung der Metastasierung und zu einem

geringeren Wachstum der Tumorzelle (Baselga, 2001). Bei Speicheldrüsenkarzinomen wurde eine Korrelation zwischen erhöhter EGFR-Expression und Lymphknotenmetastasierung festgestellt, was zu der Annahme führt, dass EGFR die lymphogene Metastasierung erleichtert (Schneider *et al.*, 2016).

Nivolumab ist ein Checkpoint-Inhibitor, welcher an den PD-1-Rezeptor (programmed cell death protein 1) auf T-Zellen bindet und so die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation stimuliert. Einige Tumore haben die Fähigkeit PD-L1 (programmed death ligand 1) zu produzieren und sich so vor dem Immunsystem zu schützen, da PD-L1 zur Inaktivierung der T-Zellen führt. Nivolumab verhindert die Bindung von PD-L1 an T-Zellen – so kann das Immunsystem den Tumor weiter T-Zell-vermittelt bekämpfen (Li *et al.*, 2016).

1.1.4 Prognose von HNSCC

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region zählen seit Jahren zu den weltweit häufigsten Krebsarten. Sie sind nach wie vor häufig nicht heilbar und das 5-Jahres-Überleben bei Patienten mit HNSCC liegt bei 65 % (Siegel *et al.*, 2020).

Die Prognose ist aufgrund der Heterogenität der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich schwierig einzuschätzen und auch sehr variabel. Entscheidend ist neben der anatomischen Lokalisation, die die Operabilität beeinflusst, auch die Einteilung nach dem TNM-Schema. Ziel bei einer Tumoroperation ist es, das erkrankte Gewebe restlos zu entfernen (kein Residualtumor = R0), was durch einen intraoperativ entnommenen Schnellschnitt histologisch überprüft werden kann. Bei einer R1 (= mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor) oder R2 (= makroskopisch nachweisbarer Residualtumor) Resektion muss bei einem kurativen Therapieansatz nachoperiert und die Therapie individuell angepasst werden (Ehrenfeld *et al.*, 2011).

Bei Patienten mit höher-gradigen Tumoren kommt es häufig zu einem Rezidiv, das aufgrund von mikroskopisch nicht nachweisbaren Tumorzellen im Randbereich des Primärtumors entsteht. Lymphknotenmetastasen sind abgesehen von Fernmetastasen der wichtigste prognostische Faktor. Bei

vorhandenen Halslymphknotenmetastasen wird meist eine modifizierte, radikale Neck-Dissection mit Ausräumung der Halslymphknotenlevel durchgeführt. Aber auch bei einem N = 0 Hals wird häufig eine elektive Neck-Dissection empfohlen, um okkulte Metastasen zu entfernen (Lim *et al.*, 2006).

Patienten mit HPV-positiven Plattenepithelkarzinomen haben eine bessere Prognose. Diese Tumore sprechen besser auf eine Chemotherapie an als HPV-negative, und zudem sind die Patienten häufig in einem besseren Allgemeinzustand (Chow, 2020).

Die Behandlungsmöglichkeiten von HNSCCs haben sich in der letzten Zeit, abgesehen von der Entwicklung neuer monoklonaler Antikörper wie zum Beispiel das bereits erwähnte Cetuximab, nicht wesentlich weiterentwickelt. Doch nicht zuletzt aufgrund der steigenden Lebenserwartung spielen Tumorerkrankungen eine immer größere Rolle. In den nächsten Jahren wird die Zahl der allgemeinen Krebsfälle weiter zunehmen und könnte sich laut einer Studie der IARC bis 2040 sogar verdoppeln (Wild *et al.*, 2020).

Die Behandlung von Krebs stellt nach wie vor eine enorme Herausforderung für die moderne Medizin und die Wissenschaft dar. Neue innovative Wege der Krebstherapie sollten, auch mit dem Ziel einen einheitlichen, medikamentenbasierten Therapieansatz zu entwickeln, weiterverfolgt werden.

1.2 Energie als Therapieansatz – Warburg Effekt

Fast alle Tumorzellen zeichnen sich durch einen erhöhten und beschleunigten Metabolismus aus. Daraus resultiert in vielen Fällen ein gesteigerter Energieumsatz (Holm, 2007). Schon 1924 erkannte Otto Warburg, dass Tumorzellen mehr Glukose aufnehmen und diese hauptsächlich über den Abbau zu Milchsäure (Laktat) mit einer anschließenden Sekretion des Moleküls metabolisieren (Warburg-Effekt). Gesunde Körperzellen nutzen diesen Weg der Energiegewinnung meist nur bei unzureichender Sauerstoffversorgung. Sie können bei Anwesenheit von Sauerstoff durch aerobe Glykolyse und anschließender Verwertung im Citratzyklus sowie der oxidativen Phosphorylierung 32-36 mol ATP/mol Glukose gewinnen. Die Energieausbeute bei der Milchsäuregärung beträgt im Vergleich zum vollständigen Abbau lediglich

2 mol ATP/mol Glukose (Warburg *et al.*, 1924). Das hierbei entstehende Laktat kann dann zum Beispiel durch die Leber wieder zu Glukose aufgebaut werden. Allerdings ist dieser Weg extrem energie-ineffizient, da pro synthetisiertem Glukose-Molekül sechs Energie-Äquivalente benötigt werden, in der Glykolyse aber nur netto 2 ATP zurückgewonnen werden. Dieses permanente Verlustgeschäft ist mit eine der Ursachen für den erhöhten Energieverbrauch von Tumoren. Die ineffiziente Energiegewinnung durch die Milchsäuregärung gleichen Krebszellen durch eine gesteigerte Glukoseaufnahme aus (Gatenby and Gillies, 2004, Liberti and Locasale, 2016). Die folgende Abbildung (Abb. 1) gibt einen schematischen Überblick über den Stoffwechsel und Energiebedarf von gesunden Körperzellen und Tumorzellen.

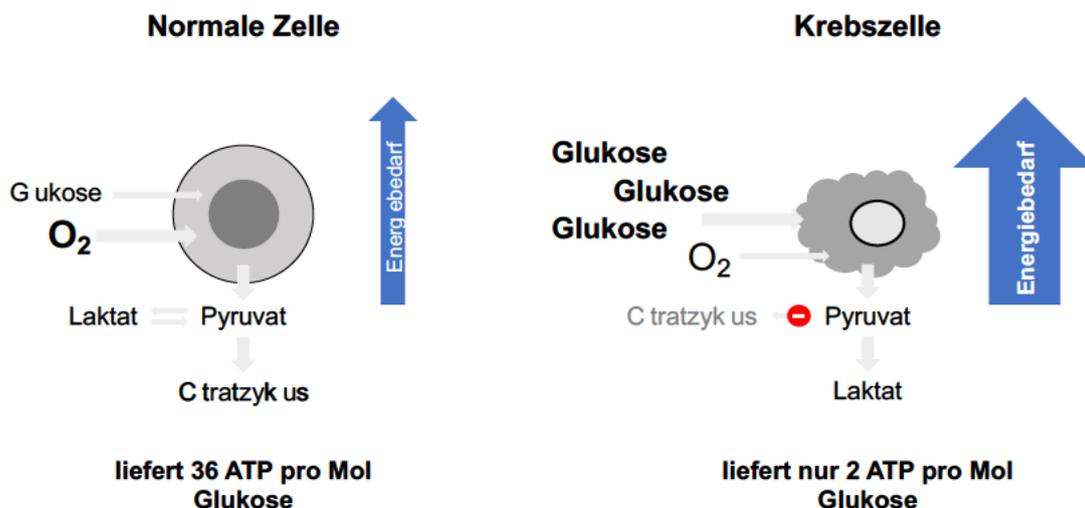


Abb. 1. Energiebedarf von Körper- und Tumorzellen im Vergleich (eigene Darstellung). Fast alle Tumorzellen haben aufgrund des erhöhten Metabolismus einen gesteigerten Energiebedarf. Die aufgenommene Glukose verstoffwechseln Tumorzellen hauptsächlich über den Abbau zu Laktat (Warburg-Effekt), was zu einer Energieausbeute von 2 mol ATP/mol Glukose führt. Gesunde Körperzellen hingegen können bei Anwesenheit von O_2 über den vollständigen Abbau 32-36 mol ATP/mol Glukose gewinnen. Die ineffiziente Energiegewinnung durch die Milchsäuregärung gleichen Krebszellen durch eine gesteigerte Glukoseaufnahme aus.

Zusätzlich benötigen Tumorzellen mehr Energie für die Zellteilung und den permanenten Masseaufbau (Tanner and Rutter, 2016). Der Energieverbrauch, verursacht durch die Krebszellen, führt bei Tumorkranken häufig zu Gewichtsverlust und Kachexie, was neben Nachtschweiß und Fieber zur typischen B-Symptomatik von Tumorerkrankungen zählt.

Allerdings bietet dieser erhöhte Energiebedarf einen möglichen zentralen Angriffspunkt, indem man entweder verhindert, dass der Tumor die benötigte Energie bekommt oder man verfolgt den in dieser Arbeit verwendeten Ansatz, den Tumor durch die Simulation beziehungsweise Induktion eines sogenannten „Low-Energy-Metabolismus“ zu täuschen. In letzterem Ansatz gibt man dem Tumor im Grunde genommen die Information, dass nicht ausreichend Energie für Wachstum und/oder Proliferation vorhanden ist. Eine mögliche Form, einen solchen Low-Energy-Metabolismus zu induzieren, ist die sogenannten Kalorien-Restriktion. Die wissenschaftliche Erforschung dieses Phänomens liefert mittlerweile auf molekularer, metabolischer und biochemischer Ebene eine Vielzahl an Erkenntnissen, die die Grundlagen für eine Reihe an Therapiemöglichkeiten von Tumoren darstellen.

1.2.1 Kalorien-Restriktion

Kalorien-Restriktion meint eine permanent um ca. 10-30 % verminderte Aufnahme an Nahrungsenergie. Schon 1947 wurden erste Versuche zur Kalorien-Restriktion an Mäusen durchgeführt und lebensverlängernde sowie gesundheitsfördernde Einflüsse erkannt (Ball *et al.*, 1947). Erstaunlich ist, dass eine Reduktion der aufgenommenen Kalorien in verschiedensten Organismen sowohl zu einer erhöhten Lebensdauer als auch zu einer Verbesserung der allgemeinen Gesundheit führt (siehe Abb. 2) (Fontana and Partridge, 2015, Escobar *et al.*, 2019). Die Lebensspanne von Hefe, von *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila* kann sich vervielfachen. Bei Mäusen und Ratten kann durch Kalorien-Restriktion die Lebenszeit um 30-50 % und beim Menschen nach Schätzungen um ca. 10 % verlängert werden.

Kalorienrestriktion

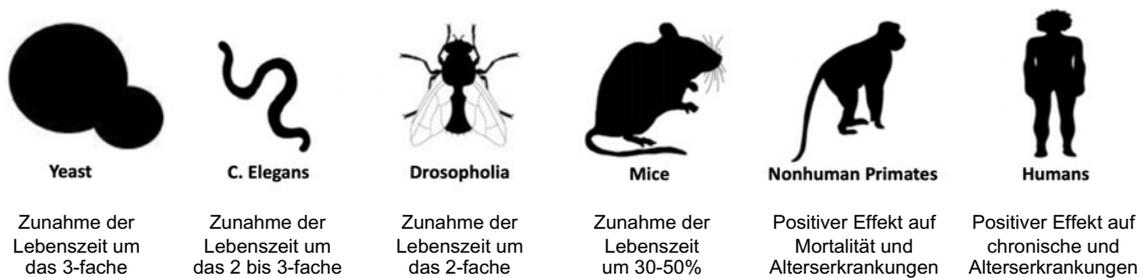


Abb. 2. Einfluss der Kalorien-Restriktion auf eukaryotischen Zellen und Organismen (modifiziert nach Escobar *et al.*, 2019). Kalorien-Restriktion führt in verschiedensten Organismen sowohl zu einer erhöhten Lebensdauer als auch zu einer Verbesserung der allgemeinen Gesundheit.

Neben der Lebensverlängerung kommt aber noch ein weiterer wesentlicher Effekt hinzu: eine drastische Reduzierung der Morbidität, unter anderem begründet durch die Risikosenkung von typisch altersbedingten Krankheiten. In einer Studie mit Rhesusaffen konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Kalorien-Restriktion zu einem verbesserten Stoffwechsel sowie zu einem verzögerten Auftreten von altersbedingten Krankheiten führt. Außerdem konnte so das Risiko an Typ-2-Diabetes, an Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder an Krebs zu sterben, gesenkt werden (Colman *et al.*, 2014, Mattison *et al.*, 2012). Auch beim Menschen konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Durch eine permanente Kalorien-Restriktion besteht ein geringeres Risiko für Typ-2-Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, neurodegenerative oder maligne Erkrankungen (Fontana *et al.*, 2011, Madeo *et al.*, 2019).

Eine reduzierte Energieaufnahme kann durch eine Restriktion von Lipiden, Kohlenhydraten und/oder Aminosäuren/Proteinen erreicht werden. Der dadurch erreichte Effekt wird im Folgenden als Low-Energy-Metabolismus bezeichnet. Aufgrund der geringeren verfügbaren Energiemenge konzentriert sich die Zelle in diesem Zustand auf essentielle Mechanismen wie die Atmung und die Reparatur von DNA-Schäden (siehe Abb. 3 – grün). Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Proliferation werden hingegen aufgrund des geringen Energieangebots in diesem Zustand inhibiert (siehe Abb. 3 – rot). Der entscheidende Regulator, welcher abhängig vom Energielevel Zellwachstum und

Proliferation steuert, ist die Proteinkinase mTOR (mechanistic target of rapamycin). Auf die molekularen Mechanismen des Low-Energy-Metabolismus und die zentrale Bedeutung von mTOR wird im Folgenden noch ausführlicher eingegangen. Wachstum, Differenzierung und Proliferation sind Prozesse, die die Tumorentstehung und das Tumorwachstum fördern – das erklärt, warum durch Kalorien-Restriktion und dem damit einhergehenden Low-Energy-Metabolismus unter anderem das Tumorrisiko gesenkt werden kann.

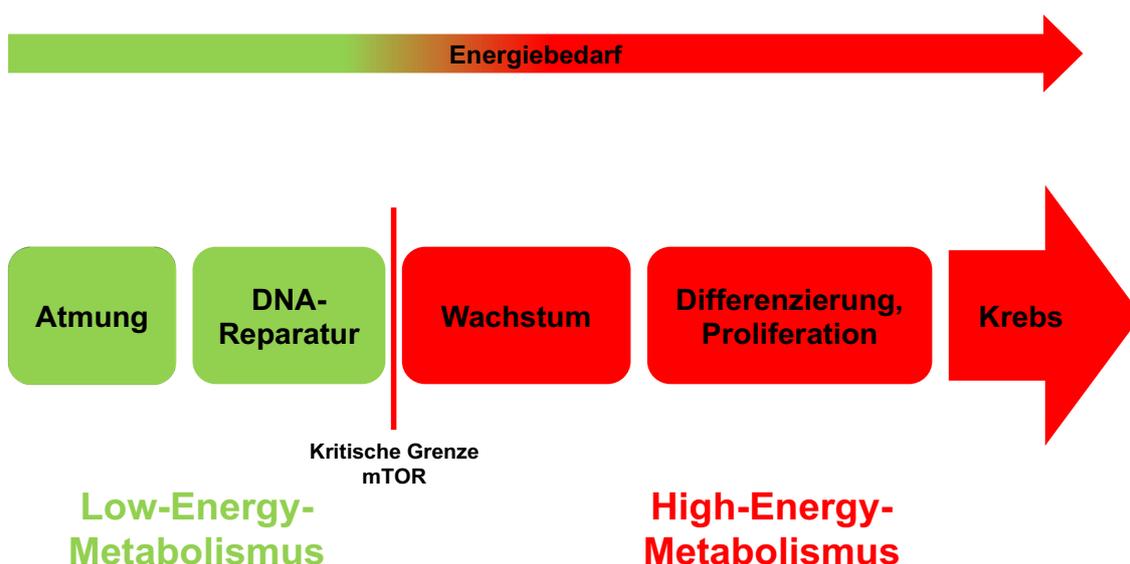


Abb. 3. Stoffwechselprozesse des High- und Low-Energy-Metabolismus im Vergleich. Aufgrund des geringen Energieangebots konzentriert sich die Zelle im Low-Energy-Metabolismus, reguliert durch mTOR, auf essentielle Mechanismen wie die Atmung und die Reparatur von DNA-Schäden. Wenn aber mehr Energie verfügbar ist, wird diese für Wachstum, Differenzierung und Proliferation verwendet. Dies sind Prozesse, die die Tumorentstehung begünstigen.

1.2.2 Aminosäure-/Protein-Restriktion

Interessant ist, dass eine Restriktion der Menge an aufgenommenen Aminosäuren die gleichen Effekte zeigt wie eine reduzierte Aufnahme von Kohlenhydraten beziehungsweise Lipiden, sogar ohne Reduktion der Gesamtkalorienzahl (Fontana and Partridge, 2015). Schon 1959 konnten Sugimura und Kollegen zeigen, dass Diäten, bei denen nur eine essentielle Aminosäure fehlt, einen Low-Energy-Metabolismus induzieren können, was mit einem Gewichtsverlust sowie einer Reduktion des Tumorwachstums einherging (Sugimura *et al.*, 1959). Die Induktion des Low-Energy-Metabolismus führt zu einer allgemein verbesserten Gesundheit wie auch zu einer Verlängerung der

Lebensdauer. Hintergrund ist ein verbesserter, insulin-unabhängiger Glukosestoffwechsel, ein geringeres Risiko an Adipositas zu erkranken und auf zellulärer Ebene deutlich weniger Proliferation, Wachstum und Entwicklung. Außerdem kann so der oxidative Stress stark gesenkt werden (Ables *et al.*, 2016). Eine sehr überzeugende Studie, die das Potential der Protein-Restriktion im Zusammenhang mit Gesundheit und Krebs belegt, wurde 2014 von Levine und Kollegen in „Cell Metabolism“ publiziert (Levine *et al.*, 2014). Sie bezieht sich auf ausgewählte Daten von über 6.000 Probanden mit einem Alter von 50 und mehr Jahren, der NHANES-III-Studie aus den USA, die regelmäßig neu aufgelegt wird, um repräsentativ den Ernährungs- und Gesundheitszustand der US-Bevölkerung zu dokumentieren. Die ausgewählten Probanden wurden simpel in drei Gruppen eingeteilt: eine Gruppe mit einem hohen (über 20 %), eine Gruppe mit einem mittleren (10-19 %) und eine Gruppe mit einem niedrigen Proteinkonsum (unter 10 %). Die Gruppe mit dem hohen Proteinkonsum hatte ein 75 % höheres Gesamtrisiko zu sterben und ein vierfach erhöhtes Risiko innerhalb der nächsten 18 Jahre an Krebs zu sterben. Außerdem stieg das Risiko an Diabetes mellitus Typ II zu sterben um das Fünffache. Solch hohe prozentualen Veränderungen innerhalb der Risikobewertung sind für ernährungswissenschaftliche Studien ungewöhnlich und zeigen die Relevanz und Effizienz des Low-Energy-Metabolismus auf.

1.2.3 Methionin-Restriktion

Die 20 (bzw. 21) proteinogenen Aminosäuren des Menschen sind nicht nur Grundbausteine der Proteine, sondern mit ihren Abbauprodukten auch Bestandteile aller wichtigen Stoffwechselwege. Bei Glukosemangel kann diese aus den Abbauprodukten in Form der Ketosäuren wie α -Ketoglutarat, Pyruvat beziehungsweise Oxalacetat aus den Aminosäuren durch die Glukoneogenese synthetisiert werden. Die meisten Aminosäuren sind glukogen, eine Ausnahme bilden lediglich Lysin und Leucin, welche rein ketogen sind und zu Acetyl-CoA abgebaut werden können. Die Endprodukte des Aminosäureabbaus, wie α -Ketoglutarat, Oxalacetat, Fumarat und Succinyl-CoA, sind Metabolite des Citratzyklus, oder stehen wie Acetyl-CoA oder Pyruvat mit diesem eng in Verbindung (Röhm, 2014). Außerdem steht der Aminosäurestoffwechsel über

Acetyl-CoA mit dem Lipidstoffwechsel und über Argininosuccinat mit dem Harnstoffzyklus im engen Zusammenhang. Der Harnstoffzyklus wiederum ist über Carbamoylphosphat und Aspartat eng verknüpft mit dem Auf- und Abbau der Nukleinsäuren, also auch mit der DNA-Synthese. Aminosäuren spielen eine zentrale Rolle im gesamten Metabolismus. Eine Reduktion der verfügbaren Aminosäuren hat somit enorme Auswirkungen auf viele bedeutende Stoffwechselwege.

Dabei ist es nicht notwendig die Gesamtmenge der aufgenommenen Proteine zu senken. Es reicht sogar aus, wenn man eine ausgewählte Aminosäure stark reduziert. Die Aminosäure Methionin hat sich dabei etabliert, da sie gegenüber den anderen Aminosäuren eine übergeordnete Stellung besitzt. Sie stellt unter anderem die im Anabolismus energieaufwändigste Aminosäure dar (Old *et al.*, 1991). Dies ist wahrscheinlich auch der Grund, warum Methionin als Indikator für eine ausreichenden Energiezufuhr steht und bei geringen Konzentrationen zur Induktion des Low-Energy-Metabolismus in einer Zelle führt (Bhattacharyya and Varshney, 2016). Ebenfalls ist dies vermutlich die Ursache, weshalb Methionin bei fast allen Lebewesen als Start-Aminosäure gilt – nur bei einer ausreichenden Methionin-Konzentration sind genügend Energieressourcen vorhanden, die der Körper für die energetisch sehr aufwändige Proteinbiosynthese verwenden kann. Die Thiolstruktur des Methionins kann von humanen Zellen nicht gebildet werden, also kann der Körper Methionin nicht *de-novo* synthetisieren (Röhm, 2014). Allerdings können normale Körperzellen Methionin zumindest teilweise aus Stoffwechselprodukten wie S-Adenosyl-Methionin (SAM) oder Homocystein regenerieren.

1.2.4 Molekulare Mechanismen des Low-Energy-Metabolismus

Der Low-Energy-Metabolismus führt zu komplexen Veränderungen. Mittlerweile können diese Veränderungen und die daraus resultierenden positiven Effekte auf molekularer Ebene sehr gut erklärt werden. Im Folgenden werden einige der bedeutendsten molekularen Mechanismen kurz beschrieben.

(1) mTOR,
 (2) die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK),
 (3) IGF-1 (insulin like growth factor 1) und FGF-21 (fibroblast growth factor 21),
 (4) der Mechanismus der Autophagie und
 (5) die Proteingruppe der Sirtuine
 sind wichtige Faktoren, die bei der Umsetzung des Low-Energy-Metabolismus relevant sind und in ihrer Summe für die positiven Effekte in Form der Lebensverlängerung und der stark gesenkten Morbidität sowie der Vermeidung von altersassoziierten Krankheiten verantwortlich sind.

(1) mTOR ist Bestandteil eines Proteinkomplexes, der maßgeblich an der Regulation von Zellwachstum und Proliferation beteiligt und neben Wachstumsfaktoren vor allen Dingen sensitiv gegenüber dem Energielevel einer Zelle ist. Das kleine G-Protein Rheb, welches auf der einen Seite durch Wachstumsfaktoren wie Insulin, aber auch durch die Konzentration freier Aminosäuren reguliert wird, ist für die Aktivität der Proteinkinase mTOR essentiell. Ein hohes Energielevel, das mit einer hohen ATP-Menge (beziehungsweise genauer einem hohen ATP/AMP-Quotienten) korreliert, führt zur permanenten Stimulation und Aktivierung von mTOR und damit zu vermehrtem Wachstum und Proliferation (Abb. 4). Auch eine Senkung der verfügbaren freien Aminosäuren (AS) (Weichhart, 2018, Saxton and Sabatini, 2017) und selbst die alleinige Senkung der Menge des verfügbaren Methionins (Met) inhibieren mTOR und unterdrücken somit Wachstum und Proliferation. Zhou und Kollegen beschreiben, dass mTOR über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor T1R reguliert werden kann, welcher ein direkter Sensor für die Menge an verfügbaren Aminosäuren, unter anderem Methionin, ist (Zhou *et al.*, 2016). Eine andere Möglichkeit, wie die Zelle indirekt mangelndes Methionin messen kann, ist über das Protein SAMTOR. SAMTOR ist ein SAM-Sensor, welcher über die Interaktion mit dem GTPase-aktivierenden Protein GATOR1 die mTOR-Aktivität hemmen kann (Gu *et al.*, 2017). SAM und Methionin sind sehr eng miteinander verknüpft, in nur einem Reaktionsschritt kann aus Methionin und ATP SAM gebildet werden und aus SAM kann wiederum Methionin synthetisiert

werden. Daher korreliert eine geringe SAM-Konzentration mit einer niedrigen Methionin-Konzentration und beides führt zur Inhibition von mTOR. Auch auf pharmakologischem Weg kann mTOR gehemmt werden: Das Immunsuppressivum Rapamycin (auch bekannt unter Sirolimus) kann durch die Inhibition von mTOR einen Low-Energy-Metabolismus induzieren und eine Kalorien-/Methionin-Restriktion mit den bereits beschriebenen positiven Effekten simulieren (Weichhart, 2018).

(2) Die AMP-Kinase ist ein in allen eukaryotischen Geweben vorkommendes heterotrimeres Protein, welches eine große Rolle bei der Regulation einer Vielzahl weiterer Enzyme spielt. Die Aktivität der AMPK wird über den AMP/ATP-Spiegel reguliert, was durch eine De-Phosphorylierung erfolgt. AMP entsteht beim Abbau des energiereichen ATP (Adenosintriphosphat) und eignet sich daher als Energie-Sensor der Zelle. Bei einem hohen AMP/ATP-Quotienten werden energieaufwändige Prozesse wie die Glykogen-, Cholesterin- und Fettsäurebiosynthese inhibiert. Die verantwortlichen Enzyme, wie zum Beispiel die Glykogensynthase, die Acetyl-CoA-Carboxylase oder die HMG-CoA-Reduktase, werden von der AMPK gehemmt (Chung Thong *et al.*, 2010) (Abb. 4). Insbesondere wird auch der bereits beschriebene Proteinkomplex mTOR gehemmt, was zur Inhibition von Wachstum und Proliferation führt (Abb. 4). Um für Energienachschub zu sorgen, wird gleichzeitig über die Aktivierung des Enzyms Phosphofruktokinase-2 die Glykolyse gefördert. So schützt die AMP-Kinase die Zelle vor Energiemangel.

(3) Somatotropin (auch growth hormone, (GH)) ist ein hypophysäres Wachstumshormon, welches neben direkten Effekten auf das Zielgewebe seine Wirkung unter anderem über Transkriptionsfaktoren und einer veränderten Expression von IGF-1 und FGF-21 vermittelt. Eine regelmäßige hohe Energieaufnahme führt zu einer gesteigerten IGF-1 Sekretion und zur gleichzeitigen Senkung von FGF-21 durch die Leber. IGF-1 signalisiert, dass genügend Energie vorhanden ist und führt über die Aktivierung von mTOR wie auch Insulin, zu einem vermehrten Zellwachstum und erhöhter Proliferation (Daniel and Wenzel, 2014b) (Abb. 4). Im Gegensatz dazu wird FGF-21 vermehrt bei Energiemangel ausgeschüttet und signalisiert einen Low-Energy-

Metabolismus. Es werden vermehrt GLUT1- und GLUT4-Transporter in die Zellmembranen eingebaut, was eine erhöhte insulinunabhängige Glukoseaufnahme ermöglicht. Sowohl eine Kalorien- als auch eine Methionin-Restriktion führen zu einer Senkung des IGF-1- und zu einer Erhöhung des FGF-21-Levels. Das erklärt auch den positiven beziehungsweise krankheitspräventiven Effekt einer dauerhaften Kalorien-Restriktion auf Diabetes Typ-II Erkrankungen (Liu *et al.*, 2018).

(4) Ein weiterer grundlegender Mechanismus der bei einem geringen zellulären Energieniveau induziert wird, ist die Autophagie (Madeo *et al.*, 2015). Man kann diesen Prozess als zelluläres Recycling beschreiben: Defekte Zellstrukturen wie fehlgefaltete Proteine, aber auch ganze Organellen wie defekte Mitochondrien werden abgebaut. Die dabei entstehenden Abbauprodukte werden in Salvage Pathways wiederverwertet. So kann bei einem niedrigen Energieniveau der zelluläre Energiebedarf über die endogenen Abbauprodukte gedeckt werden (Rubinsztein *et al.*, 2011). Die Autophagie wird bei einem niedrigen Energieniveau und dem damit einhergehenden erhöhten AMP/ATP-Spiegel direkt über die AMPK aktiviert (Abb. 4). Zusätzlich führt auch die Inhibition von mTOR zur Induktion der Autophagie (Kim *et al.*, 2011, Egan *et al.*, 2011).

(5) Eine Gruppe von Proteinen, die ebenfalls im Low-Energy-Metabolismus aktiviert werden, sind die Sirtuine. Das bei Energiemangel erhöhte NAD^+/NADH -Verhältnis fördert die SIRT1-Aktivität und führt zur Histon-Deacetylierung, wodurch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen DNA und Histonen erhöht wird, die in einer dichteren Chromatinstruktur resultiert (Fang *et al.*, 2017). Sirtuine steuern über die graduelle Packungsdichte der DNA die Transkriptionsrate von bestimmten Genen, was unter anderem zur verminderten Expression Apoptose-assoziiierter Gene – wie zum Beispiel p53 – führen kann (Daniel and Wenzel, 2014a). Sie sind maßgeblich an der Ausbildung epigenetischer Faktoren beteiligt. Die Epigenetik spiegelt eine weitere Möglichkeit der Genregulation wider, die über den reinen genetischen Code hinausgeht – die bekannteste Form ist die DNA-Methylierung. Kalorien-Restriktion ermöglicht außerdem die Bindung von FOXO3a und p53 am Promotor von SIRT1, wodurch die SIRT1-Expression weiter vorangetrieben wird. Weitere

Auswirkungen der erhöhten Sirtuinaktivierung sind die Deacetylierung und somit Aktivierung der AMPK, die Reparatur von DNA-Schäden (auf die im Folgenden noch genauer eingegangen wird) sowie ein verringertes Zellwachstum und eine verminderte Zellproliferation (Abb. 4) (Alves-Fernandes and Jasiulionis, 2019).

Die molekularbiologischen Auswirkungen, welche durch den Low-Energy-Metabolismus induziert werden, sind äußerst komplex. Die folgende Abbildung (Abb. 4) soll einen Überblick über die wichtigsten Mechanismen, vermittelt über (1) mTOR, (2) die AMP-Kinase, (3) die IGF-1-Achse, (4) den Mechanismus der Autophagie und (5) die Proteingruppe der Sirtuine und deren Zusammenspiel, verschaffen.

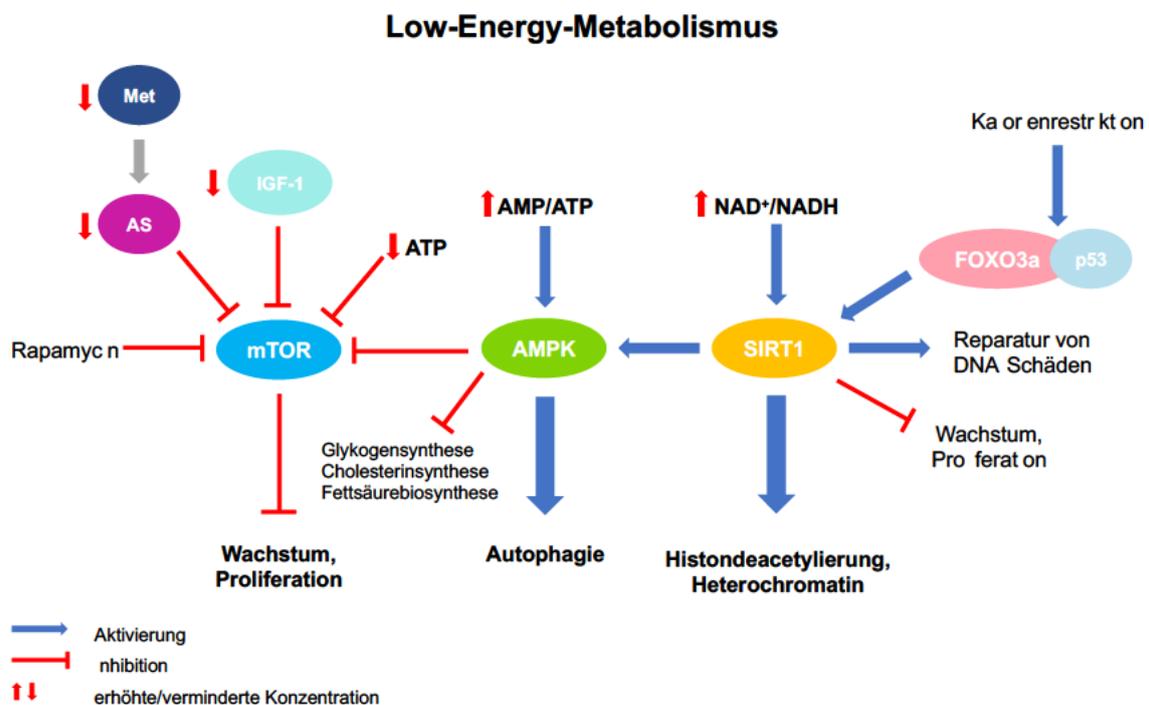


Abb. 4. Überblick über Kalorien-Restriktion regulierte molekulare Mechanismen (modifiziert nach Gillespie *et al.*, 2016). Ein erhöhtes AMP/ATP-Verhältnis führt zur verstärkten Aktivierung der AMP-Kinase. Die AMPK hemmt sowohl die Glykogensynthese, die Cholesterinsynthese, die Fettsäurebiosynthese als auch die mTOR-Aktivität. Eine verringerte Aktivität von mTOR, welche neben der AMPK durch eine geringe ATP-, IGF-1- und AS-Konzentration oder zum Beispiel durch eine geringe Met-Konzentration erreicht wird, inhibiert Wachstums- und Proliferationsprozesse. Das erhöhte NAD⁺/NADH-Verhältnis fördert die SIRT1-Aktivität, was unter anderem zur Deacetylierung und zur Hochregulierung der AMPK und ihrer Funktion führt. Kalorien-Restriktion ermöglicht außerdem die Bindung von FOXO3a und p53 im Promotor von SIRT1, wodurch die SIRT1-Expression weiter vorangetrieben wird. SIRT1 fördert über die Histondeacetylierung auch die Etablierung und Aufrechterhaltung von Heterochromatin und verringert das Zellwachstum und die Zellproliferation. Eine weitere Funktion von Sirtuinen ist die Reparatur von DNA-Schäden.

1.2.5 Das Potential des Low-Energy-Metabolismus als Therapieansatz gegen Krebs

Trotz überzeugender Ergebnisse aus den Studien und Forschungsarbeiten über Kalorien-, Protein- oder Aminosäure-Restriktion, stellt sich doch grundlegend die Frage, ob das Konzept des Low-Energy-Metabolismus als Therapieform gegen Krebs geeignet ist. So positiv ein verlängertes Leben bei geringer Morbidität und einer geringeren Wahrscheinlichkeit altersassoziierter Erkrankungen auch zu bewerten ist, ist der Kampf gegen Krebs eventuell eine vollkommen andere Herausforderung.

In der bereits erwähnten Studie von Levine und Kollegen wurden in weiteren *in vivo* Versuchen an Mäusen untersucht, welchen Einfluss eine Protein-Restriktion auf das Tumorwachstum beziehungsweise den Prozess der Metastasierung haben kann. Der Versuchsaufbau war wie folgt. Es wurden zwei Gruppen mit Mäusen gebildet: Eine Gruppe wurde, gemessen an der Gesamtkalorienzahl, kontinuierlich mit einer hohen (18 %) und die andere Gruppe mit einer niedrigen Proteinmenge (4-7 %) gefüttert. Im ersten Versuch wurden den beiden Gruppen jeweils 20.000 murine Melanomzellen (B16) implantiert. Im weiteren Verlauf wurde die Tumorgöße beider Gruppen verglichen. Nach 39 Tagen waren die Tumore in der Gruppe mit der hohen Proteinmenge im Schnitt 78 % größer als die der Vergleichsgruppe.

In einem zweiten Versuch wurden 20.000 murine Brustkrebszellen (4T1) an Mäusen unter den bereits beschriebenen Diätbedingungen getestet. In der Gruppe mit der hohen Proteinmenge bildeten sich bei 100 % der Versuchstiere Tumore aus, während nach 18 Tagen nur 70 % der Tiere mit der niedrigen Proteinmenge einen Tumor aufwiesen. Am Ende des Experiments, nach 39 Tagen, hatten 20 % der Tiere der Gruppe mit der geringen Proteinmenge noch immer keinen Tumor ausgebildet, obwohl Ihnen 20.000 lebende, aggressive Tumorzellen implantiert wurden (Levine *et al.*, 2014).

Eine andere Studie, die von Hosios und Kollegen 2016 in *Developmental Cell* publiziert wurde, zeigt, welche große Relevanz Aminosäuren für das Zellwachstum haben (Hosios *et al.*, 2016). In dieser Publikation wird aufgezeigt, dass der Großteil der in proliferierenden Zellen entstehenden zellulären Masse durch

Aminosäuren und nicht Glukose gewonnen wird. Aufgrund der großen Bedeutung von Aminosäuren für das Wachstum von proliferierenden Zellen, bietet die Aminosäure-Restriktion somit eine effektive Möglichkeit, um eventuell die Proliferation von Krebszellen zu inhibieren.

Die Wirksamkeit einer Methionin-Restriktion gegen Krebs konnte mittlerweile sowohl durch *in vitro* als auch *in vivo* Studien gezeigt werden (Wanders *et al.*, 2020). So konnte durch die Methionin-Restriktion in verschiedenen Tumorzellen im Tiermodell eine Regression des Tumorwachstums erreicht werden (Kominou *et al.*, 2006, Hens *et al.*, 2016). Auch der Einsatz des isolierten bakteriellen Enzyms Methionase, welches Methionin zu alpha-Ketobutyrat, Methanethiol und Ammoniak spaltet, konnte in präklinischen Studien das Tumorwachstum hemmen (Cellarier *et al.*, 2003). In einigen Studien konnten durch die Kombination einer Methionin-freien Diät und einer Radio-/Chemotherapie synergistische/additive Wirkungen festgestellt werden (Gao *et al.*, 2019, Cellarier *et al.*, 2003). Zudem sind einige Tumore Methionin-abhängig und können nicht wie normale Körperzellen benötigtes Methionin selbst zum Beispiel aus Homocystein regenerieren. Dadurch könnte der Einfluss einer Therapie, die auf einer Methionin-Restriktion basiert, zusätzlich verstärkt werden (Cavuoto and Fenech, 2012, Chaturvedi *et al.*, 2018). Auf Grund der erfolgsversprechenden Ergebnisse ist es von großer Bedeutung, die Methionin-Restriktion auch auf molekularer Ebene im Detail zu verstehen, um so künftig eine zielgerichtete Therapie zu ermöglichen.

1.3 Kleiner Exkurs in die Altersforschung

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen, molekularen Mechanismen sind so elementar, dass sie eine grundsätzliche Bedeutung in den Bereichen Lebenszeitspanne, Morbidität und Alterserkrankungen haben. Besonders auffällig ist, dass sich die Induktion eines Low-Energy-Metabolismus drastisch auf die Vermeidung altersbedingter Erkrankungen wie Diabetes Typ II und eben auch Krebs auswirkt. In den letzten Jahren gehen Ergebnisse akademischer Veröffentlichungen sogar so weit, dass mit diesen molekularen Prozessen unter anderem das Altern auf biochemischer Ebene erklärt werden

kann und somit das Altern selbst als Ursache für viele der im Alter auftretenden Krankheiten angesehen wird (Sinclair and Matthew, 2019).

Die NAD⁺-abhängigen Sirtuine und vor allem deren epigenetische Funktion wurde in einem vorherigen Abschnitt bereits kurz beschrieben. Neben der Möglichkeit durch die Deacetylierung von Histonen den Verpackungsgrad der DNA und somit die Gentranskription auf epigenetischer Ebene zu regulieren, sind die Proteine auch maßgeblich an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt. Glatte DNA-Brüche können bei der Zellteilung durch mechanische Belastung oder aber durch Strahlenschäden entstehen. Ein Teil der Sirtuine wird dann von der eigentlichen Position innerhalb des Genoms zur Reparaturstelle rekrutiert und verbleibt dort, bis die DNA-Reparatur abgeschlossen ist. Allerdings können in diesem Fall die abgezogenen Sirtuine ihre Aufgabe der DNA-Packung und der daraus resultierenden Genomorganisation nicht mehr erfüllen.

Seit langem ist es ein großes Problem, die Alterung biologisch zu erklären und bis dato gab es keinen molekularen Prozess, der das Altern auch nur in irgendeiner Form nachweislich erklären konnte. Neben der Theorie, dass Altern ein genetisches Programm ist, welches von der Zelle gezielt aktiviert wird – im Grunde also eine über den Lebenszeitraum ausgedehnte Ganzkörper-Apoptose – gibt es ebenso die Theorie, dass das Altern schlicht und ergreifend durch die Regeln der Entropie zu erklären ist. Ein System hoher Ordnung strebt auf Dauer dem Chaos entgegen und selbst eine Zuführung permanenter Energie verhindert diesen Prozess nicht, sondern verzögert das Chaos nur. Dies könnte sich auf zellulärer Ebene in einem Zerfall der epigenetischen Strukturen äußern und somit zu einer Dysregulation der Gentranskription führen, die dann wiederum zu den altersbedingten Erscheinungen führt, induziert durch eine massiv veränderte Gentranskription. Auf Grund von Ergebnissen aus dem Organismus Hefe (Sinclair and Guarente, 1997, Sinclair *et al.*, 1997) waren die Sirtuine und die epigenetische Dysregulation der Transkription ein geeigneter Kandidat für diesen entropie-bedingten Alterungsprozess.

Doch wie lässt sich eine solche Theorie zumindest ansatzweise belegen? Die Forschergruppe des Gerontologen David A. Sinclair veröffentlichte 2019 auf dem Reprint Server BioRxiv (betrieben vom Cold Spring Harbor Laboratory) die Arbeit

„DNA Break-Induced Epigenetic Drift as a Cause of Mammalian Aging“ (Hayano *et al.*, 2019). Zuerst wurde eine transgene Maus generiert, die über einen Tamoxifen induzierbaren Promotor das Gen *I-Ppol* exprimieren kann. Dieses Gen entstammt dem Schleimpilz *Physarum polycephalum* und hat eine ähnliche Wirkungsweise wie das CRISPR-System. Ein enzymatischer Komplex beinhaltet eine RNA-Sequenz und fährt mit dieser das Genom ab. Bei einer Übereinstimmung (dem Vorkommen der komplementären Sequenz innerhalb des Genoms) wird die DNA an der entsprechenden Stelle geschnitten. Allerdings beträgt die benötigte Sequenzhomologie im Vergleich zum CRISPR-System bei *I-Ppol* 20 Basen, was die Spezifität drastisch erhöht und zweitens wird die DNA „blunt“ geschnitten, das heißt, es kommt zu einem glatten DNA-Bruch ohne Nukleotidüberhang. Dies hat zur Folge, dass es entgegen dem CRISPR-System nicht zu einer Reparatur mit irregulärem Crossover und eventuell anschließendem knock-out des Gens kommt, sondern das zelluläre System den Doppelstrangbruch simpel wieder repariert, da solche glatten Doppelstrangbrüche allein auf Grund mechanisch wirkender Scherkräfte mehrere Dutzendmale pro Tag in einer Zelle vorkommen können. *I-Ppol* erkennt die Sequenz CTCTCTTAA▼GGTAGC, die 20x im Mausgenom in nicht codierenden Bereichen vorkommt.

Die gentechnisch veränderten Mäuse werden als ICE-Mäuse bezeichnet. ICE steht hierbei für „Inducible Changes in the Epigenome“ (induzierbare Veränderungen im Epigenom). Durch die Verabreichung einer geringen Dosis (360 mg/kg) Tamoxifen im Futter über drei Wochen an vier bis sechs Monate alten ICE-Mäusen wurde das Gen aktiviert, um einen sogenannten „Epigenetischen Shift“ zu erzeugen. Die DNA wird kontinuierlich durch *I-Pol* an den 20 Stellen geschnitten und die endogenen Sirtuine immer wieder vom Genom zu den Reparaturstellen abgezogen. Während der dreiwöchigen Genaktivierung durch Tamoxifengabe waren zwischen ICE- und normalen Mäusen keine Unterschiede zu erkennen. Nach einem Monat gab es jedoch schon erste visuelle Unterschiede: Die ICE-Mäuse zeigten eine leichte Alopezie (Haarverlust) sowie einen Pigmentverlust an Füßen, Schwanz und Ohren. Nach zehn Monaten zeigten sich noch deutlichere Unterschiede: Bei allen ICE-

Mäusen, jedoch bei keiner Maus der Kontrollgruppe, zeigten sich neben den bereits beschriebenen klassischen Altersmerkmalen auch ein verringertes Körper- und Fettgewicht sowie eine verminderte körperliche Aktivität (Hayano *et al.*, 2019). Auffälligstes Merkmal war, dass die Mäuse mehr als doppelt so schnell altern und im Vergleich zu den Kontrollmäusen mit 36 Monaten nur noch eine durchschnittliche Lebenserwartung von 16 Monaten hatten. Dieser Effekt konnte dosisabhängig aufgehoben werden, indem den Mäusen zusätzliche Kopien des Gens SIRT1, dem für diesen Fall wesentlichen murinen Sirtuin, ins Genom integriert wurden.

Neben der erstmaligen Möglichkeit, den Alterungsprozess auf molekularer Ebene induzieren zu können, zeigt dieses Experiment auch die komplexen Zusammenhänge zwischen Energielevel, Metabolismus, Ursachen von Krankheiten und Alterung und führt zu der Theorie, dass das Altern selbst Hauptursache der meisten Erkrankungen ist. Maßgeblich ist auch hier, dass ein Low-Energy-Level die Sirtuine aktiviert. NAD⁺, ein stark ansteigender Metabolit im Falle mangelnder Energie, aktiviert die Sirtuine. Diese können wiederum die in Abb. 4 gezeigten Mechanismen aktivieren und in einem molekularen Netzwerk Einfluss auf andere den Low-Energy-Metabolismus induzierende Faktoren – maßgeblich mTOR – nehmen und so den Prozess verstärken. Aus diesem Grund ist NAD⁺ eines der am häufigsten konsumierten Nahrungsergänzungsmittel der letzten Jahre.

Grundsätzlich stellt sich also die Frage, ob die Prozesse der Kalorien-Restriktion nicht mit Hilfe von Wirkstoffen induziert werden können. Dies würde im Grunde eine Therapie altersbedingter Erkrankungen wie Diabetes Typ II und die Vermeidung von Krebs ermöglichen, und zwar bevor die Krankheit überhaupt erst entsteht.

1.3.1 Caloric Restriction Mimetics

Wie in der NHANES-Studie und in den Mausversuchen bereits gezeigt (Levine *et al.*, 2014) kann die Induktion eines Low-Energy-Metabolismus mittels Aminosäure-Restriktion massiven Einfluss auf die Entstehung von Krebs sowie dessen Progression im Krankheitsfall ausüben. Dem entsprechend wird die

Relevanz, die Induktion eines Low-Energy-Metabolismus als krebstherapeutische Strategie einzusetzen, offensichtlich. Doch wie kann man dies nicht nur über die Nahrungsaufnahme, sondern im besten Fall in Form eines einzelnen Medikaments umsetzen? Hier kommen die Caloric Restriction Mimetics (CRM) oder Kalorienrestriktionsmimetika ins Spiel. Diese Gruppe bezeichnet Wirkstoffe (Medikamente und auch Nahrungsergänzungsmittel), die den Low-Energy-Metabolismus nachahmen beziehungsweise induzieren, ohne dass die Gesamtkalorienzufuhr reduziert beziehungsweise die grundsätzliche Ernährung in Form einer Diät geändert werden muss. Die Wirkstoffe sollen an den bereits erläuterten Stellschrauben des Stoffwechsels eingreifen und so zu den positiven Effekten, wie einem geringeren Tumorwachstum, einer allgemein verbesserten Gesundheit und einer längeren Lebensdauer, durch den Low-Energy-Metabolismus führen.

Potentielle Wirkstoffe, die als CRM in Frage kommen, sind zum Beispiel das bereits beschriebene Rapamycin sowie Metformin, Resveratrol oder NAD⁺ beziehungsweise NAD⁺-Verstärker (Sinclair and Matthew, 2019). Eine Studie von Madeo und Kollegen, die 2019 in *Cell Metabolism* publiziert wurde, konnte zeigen, dass das Konzept der CRM per se erfolgreich ist. In dieser Studie wurden neben Rapamycin, Metformin, Resveratrol (und anderen Sirt1-Aktivatoren) auch Spermidin, Aspirin und (Poly)phenole untersucht. Eine Wirksamkeit einiger dieser Moleküle konnte sowohl in Mäusen als auch im Menschen nachgewiesen werden (Madeo *et al.*, 2019).

Metformin (Dimethylbiguanidhydrochlorid) ist ein bereits seit über 40 Jahren zugelassenes Medikament, welches derzeit weit verbreitet zur Behandlung von Diabetes-Mellitus-Typ 2 eingesetzt wird. Interessanterweise konnte Metformin die Lebensdauer in verschiedenen Tiermodellen (unter anderem bei Mäusen) verlängern (Martin-Montalvo *et al.*, 2013, Cabreiro *et al.*, 2013). Eine Metaanalyse über Metformin konnte zeigen, dass auch bei Menschen durch dieses Medikament die Gesamtmortalität und altersbedingte Krankheiten reduziert werden können (Campbell *et al.*, 2017). Weitere Studien untersuchten den Einfluss von Metformin auf die Autophagie, die AMPK, die Sirtuine und mTOR. Im Prinzip führt Metformin zu denselben Mechanismen, die durch den Low-

Energy-Metabolismus hervorgerufen werden: Die Autophagie wird stimuliert, die AMPK aktiviert und mTOR inhibiert. Metformin scheint ein großes Potential als CRM mit geringen Nebenwirkungen zu haben (Madeo *et al.*, 2019).

In einer anderen Studie wurde ebenfalls in Tierversuchen der Einfluss von dem bereits erwähnten Molekül NAD⁺ untersucht. Seine Wirkung beruht vor allem auf der Aktivierung der Sirtuine. So ist es nicht verwunderlich, dass eine Erhöhung des NAD⁺-Spiegels bei alten und kranken Tieren die Gesundheit fördert und die Lebensdauer verlängert (Rajman *et al.*, 2018).

Ein weiteres, erfolgsversprechendes Molekül ist Spermidin. Der lebensverlängernde und gesundheitsfördernde Effekt einer oralen Spermidinaufnahme scheint vor allem auf einer Verstärkung der Autophagie zu beruhen. Eine Studie von Madeo und Kollegen, welche 2018 in Science publiziert wurde, beschreibt neben der molekularen Wirkung unter anderem den positiven Effekt von Spermidin auf kardiovaskuläre und maligne Erkrankungen (Madeo *et al.*, 2018). Eines der Hauptargumente für Spermidin als potentielles CRM ist, dass es natürlicherweise in nahezu allen Organismen vorkommt und man daher davon ausgehen kann, dass es, wenn überhaupt, nur geringe Nebenwirkungen hat. Im Tiermodell an Mäusen scheint eine lebenslange Spermidin-Supplementierung keinen negativen Einfluss zu haben (Eisenberg *et al.*, 2016). Diese Studien, die zum Teil in hochrangigen Fachzeitschriften publiziert wurden, konnten aufzeigen, dass der Low-Energy-Metabolismus, beziehungsweise CRMs (die diesen induzieren), durchaus eine grundsätzliche Therapieoption darstellen. CRMs liefern jetzt schon vielversprechende Ergebnisse. In weiteren Untersuchungen könnte man Kalorien-Restriktion (zum Beispiel in Form von intermittierendem Fasten) mit CRMs kombinieren und so möglicherweise synergistische und additive Effekte erzielen.

1.4 Ziel der Arbeit

Grundsätzlich sollte der Einfluss der Aminosäure-Restriktion in Form der Methionin- sowie der Cystein-Restriktion auf die Proliferation von humanen Plattenepithelzelllinien (FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25) sowie den als Kontrolle verwendeten humanen Zelllinien HeLa und HaCaT und der murinen

Fibroblastenzelllinie L929 über einen Zeitraum von sieben Tagen untersucht werden. Da bis dato keine Untersuchungen über die Methionin-Restriktion im Plattenepithelkarzinom vorliegen, sollte *in vitro* untersucht werden, ob sich diese Methode grundsätzlich als Therapieform eignet.

Ein weiterer Schwerpunkt war die Etablierung eines murinen Zellsystems, welches potentiell die zukünftige einfache und schnelle Analyse von CRMs ermöglicht. Hierzu wurde die bereits erwähnte murine Zelllinie L929 verwendet. Mit Hilfe der Massenspektrometrie (LC/MS) sollten diese Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen alle 24 h auf ihr metabolisches Profil unter Methionin-Restriktion analysiert werden, um einen metabolischen Fingerabdruck zu identifizieren, der charakteristisch für die Methionin-Restriktion beziehungsweise den induzierten Low-Energy-Metabolismus ist. Insgesamt wurden so mehr als 150 Stoffwechselprodukte aus den Bereichen des Aminosäurestoffwechsels (Aminosäuren und ihre Derivate), Metabolite des Citrat- und Harnstoffzyklus, des Kohlenhydratstoffwechsels, Pyrimidine und Purine sowie wichtige Co-Faktoren analysiert. Dabei sollten die Zellen sowohl unter proliferierenden wie nicht proliferierenden Bedingungen analysiert werden, um die beiden Situationen des Tumors – metastasierend beziehungsweise stagnierend/etabliert – simpel zu simulieren. Zusätzlich wurde der Einfluss der Methionin-Restriktion auf die Gesamtproteinmenge in L929 mittels eines modifizierten Bradfords analysiert.

So gut sich der erfolgsversprechende Ansatz der Methionin-Restriktion im Labor durchführen lässt, so schwierig gestaltet sich die Umsetzung als Therapieoption. Die Methionin-Zufuhr allein durch die Nahrungsaufnahme zu verhindern, ist kaum möglich. Im letzten Teil der Arbeit sollte daher der Einfluss von unterschiedlichen Aminosäure-Analoga untersucht werden, die als potentielle CRMs eingesetzt werden könnten. Da ein Low-Energy-Metabolismus in der Regel mit einer Inhibition/Senkung der Proliferation(srate) einhergeht, wurden die verwendeten Analoga (L- γ -Azidohomoalanin Hydrochlorid, Boc-L-Methionin, D-Cystein, D-Ethionin, D-Lysin, D-Methionin, F_{moc}-L-Methionin, N-Formyl-L-Methionin, L-Ethionin, L-Lysin und Z-DL- β -Homoalanin) in einfachen Proliferationsassays analysiert und in einem weiteren Assay auf ihre potentielle Toxizität untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Stellvertretend für das Plattenepithelkarzinom wurden folgende vier etablierten humanen HNSCC-Zelllinien verwendet: FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25. Diese Zelllinien wurden kommerziell aus der Kollektion von ATCC (deutscher Distributor LGC Standards GmbH (Wesel)) erworben. Um Besonderheiten der HNSCC-Zelllinien gegenüber anderen humanen Zellen analysieren zu können, wurden zusätzlich die humanen Zelllinien HeLa, aus einem Zervixkarzinom, und HaCaT, eine immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie, als Kontrollzellen verwendet. Des Weiteren wurde die murine Fibroblastenzelllinie L929 verwendet. Die Zelllinien HeLa, HaCaT und L929 wurden beim Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) erworben. Die verwendeten Zelllinien sind zur Übersicht in der folgenden Tabelle (Tab. 1) aufgelistet.

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

Tab. 1. verwendete Zelllinien

2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Medium/Zusatz	Hersteller
DMEM/F-12, 1:1 Mix	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm
DMEM / F-12 1:1 Mix ohne Cystin, Cystein und Methionin	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm
DMEM / F-12 1:1 Mix ohne Methionin	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dulbecco´s Modified Eagle Medium DMEM (1x)	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt

Material und Methoden

Medium/Zusatz	Hersteller
Dulbecco´s Modified Eagle Medium DMEM (1x) ohne Glutamin, Methionin und Cystin	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dulbecco´s Modified Eagle Medium DMEM (1x) ohne Methionin	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
FBS Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
L-Cystein	Merck KGaA, Darmstadt
L-Cystin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Glutamine 200mM	Biochrom GmbH, Berlin
L-Methionin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
MEM Alpha Medium (1x)	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
MEM-Alpha Sonderproduktion mit Methionin	Bio & Sell GmbH, Feucht/Nürnberg
MEM-Alpha Sonderproduktion ohne Methionin	Bio & Sell GmbH, Feucht/Nürnberg
MEM-Alpha Sonderproduktion ohne Methionin, Cystin und Cystein	Bio & Sell GmbH, Feucht/Nürnberg
Penicillin-Streptomycin (Penicillin 10.000 units/ml; Streptomycin 10.000 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
RPMI-Medium 1640 (1x)	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
RPMI-Medium 1640 (1x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
RPMI-Medium 1640 (1x) ohne Methionin	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
RPMI-Medium 1640 (1x) ohne Methionin, Cystein und Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
L-γ-Azidohomoalanin Hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Boc-L-Methionin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
D-Cysteine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
D-Ethionine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
D-Lysine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
D-Methionine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
F _{moc} -L-Methionine	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
N-Formyl-L-methionine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
L-Ethionine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
L-Lysine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Dimethyl Sulfoxide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Salzsäure 1N	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol (99,8 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Ethanol absolut	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Z-DL-β-Homoalanine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

Tab. 2. verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Reagenz	Hersteller
BSA (Rinderalbumin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
CBB (Coomassie Brilliant Blau G-250)	Merck KGaA, Darmstadt
Kristallviolett	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol (99,8 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Salzsäure 2N	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypan Blue stain 0,4 %	NanoEnTek, Seoul, Korea
Trypsin (0,5 %)/EDTA (0,2 %)-Solution (10x)	Biochrom GmbH, Berlin
WST1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

Tab. 3. verwendete Reagenzien und Chemikalien

2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe, HLC	DITABIS Digital Biomedical Imaging Systems AG, Pforzheim
Einkanalpipetten, Eppendorf Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
Präzisionswaage, WB 0200024	KERN & SOHN GmbH, Dürnwangen
Gefrierschrank, 7084 311-00	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Inkubator, Heracell™ 150i	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Kühlschrank, LCv 4010 MediLine	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Magnetrührer, MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mehrkanalpipetten, Eppendorf Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskopkamera, Leica EC3	Leica Camera AG, Hamburg
Photometer, Tecan Infinite® F50	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Pipettierhelfer, Accujet®pro	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim
Pumpe, Vacusafe	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal
Sterilbank, Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ultraschall Homogenisator, Branson ^m Ultrasonics	Emerson Technologies GmbH, Dietzenbach
Vortexgerät, Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., Karlsruhe
Wärmebad, GFL 1083	GFL GmbH, Burgwedel
Wasserbad, MB-5	Julabo GmbH, Seelbach
Zellmikroskop, Olympus CK40	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg
Zellmikroskop, EVOS XL	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Zellzähler, EVE ^M Automated Cell Counter	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Zentrifuge, 5415R	Eppendorf AG, Hamburg

Gerät	Hersteller
Zentrifuge, Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

Tab. 4. verwendete Geräte

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-Well-Platten, Nunc™ Zellkultur-Multischalen	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
96-Well-Platten, Nunc™ MikroWell™, 96-Well-Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
EVE™ Cell Counting Slides	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Gewebekulturschalen	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glaspipetten	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Petrischalen, Nunc™	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Pipettenspitze, epT.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg
Reagiergefäße, SafeSeal	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Zellkulturflaschen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellschaber, Cell Scraper	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster

Tab. 5. verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.6 Lösungen

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
CBB-Lösung (2x)	60 mg CBB 100 ml 2N HCL
Kristallviolettlösung	0,5 g Kristallviolett 100 ml Methanol 400 ml dH2O

Tab. 6. verwendete Lösungen

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien wurden in dem jeweiligen Medium unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) im Brutschrank kultiviert. Dem Medium wurde jeweils 10 % fetales Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin-Streptomycin zugesetzt. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen mit dem Mikroskop hinsichtlich Proliferation oder Kontamination kontrolliert und anschließend unter sterilen Bedingungen passagiert. Zur Übersicht sind in der folgenden Tabelle (Tab. 7) die gängigen Verhältnisse, in denen die verwendeten Zelllinien passagiert wurden, aufgelistet.

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

Tab. 7. Übersicht der gängigen Splitverhältnisse der Zelllinien, abhängig von der individuellen Wachstumsgeschwindigkeit.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zuerst mit 10 ml PBS gewaschen, um Medienrückstände sowie tote Zellen zu entfernen. Das Lösen der adhärennten Zellen erfolgte anschließend durch die Zugabe von 3 ml einer Trypsin-/EDTA-Lösung. Die Einwirkzeit betrug je nach Zelllinie zwischen 5 und 30 min im Inkubator. Nach dem Ablösen der Zellen wurde durch die Zugabe des entsprechenden Mediums das Trypsin inhibiert.

2.2.2 Zellzählung

Der automatisierte Zellzähler EVE™ misst mittels Trypanblau-Vitalfärbung die absolute Anzahl lebender und toter Zellen. Für die Messung wurden 10 µl des Gemisches aus 20 µl Farbstoff und 20 µl Zellsuspension in eine der Zählkammern des EVE Counting Slides pipettiert. Trypanblau ist ein anionischer, saurer Farbstoff, der an Zellproteine bindet. Die intakte Zellmembran lebender

Zellen kann aufgrund seiner Größe nicht von dem Farbstoff durchdrungen werden, diese erscheinen hell, tote Zellen hingegen dunkelblau.

2.2.2.1 Zytotoxizitätsassay (ZytoTox)

Die Färbungen erfolgten nach der Kristallviolett-Methode (Gillies *et al.*, 1986). Kristallviolett (N-Hexamethyl-Pararosanilin) ist ein basischer Farbstoff, der sich an die saure DNA der Zellen anlagern kann. Die Zellen wurden zunächst in einer zuvor festgelegten Zellzahl in einer 96-Well-Mikrotiterplatte in 100 µl Medium ausgesät und 24 h zur Zelladhäsion inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Überstand entfernt, und die Zellen entsprechend den Angaben mit dem entsprechend modifizierten Medium (beziehungsweise mit entsprechendem Wirkstoff) oder als Referenzwert mit frischem Vollmedium stimuliert. Die Zellquantifizierung fand nach 24 h, 48 h, 72 h, 120 h und/oder 168 h statt. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit 50 µl/Well Kristallviolettlösung für 10 min gefärbt. Anschließend wurde die Platte dreimal in destilliertem H₂O gewaschen und an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 100 µl Methanol pro Well wurde die Absorption im Mikroplatten-Reader Tecan Infinite F50 bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt. Die photometrisch erfasste Intensität ist direkt proportional zur Zellzahl.

Datenanalyse:

Von den photometrisch bestimmten Extinktionswerten wurde zunächst der Background ($BG_{E595} \approx 0,16$) abgezogen. Die Extinktionsmittelwerte (MW) der stimulierten Zellen wurden mit der Kontrolle, also den Extinktionsmittelwerten der Zellen mit Vollmedium, verglichen. Der Referenzmittelwert wurde gleich 100 % gesetzt, die relative Zellzahl der stimulierten Zellen konnte dann folgendermaßen berechnet werden:

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

Die Standardabweichung (STABW) wurde mit Hilfe des Programms Microsoft® Excel errechnet. Zur Berechnung der relativen Standardabweichung in Prozent wurde folgende Formel angewendet:

$$\left(\frac{\text{STABW}_{(\text{Wert } x)}}{\text{MW}_{(\text{Wert } x)}} \right) \times \text{RZ}_{(\text{Wert } x)} = \text{STABW}_{(\text{RZ})} \text{ in Prozent}$$

2.2.2.2 Zytotoxizitätsassay nach Methionin- beziehungsweise kombinierter Methionin-/Cystein-Restriktion

In Vorversuchen wurden unterschiedliche Zellzahlen/Well (100, 1.000, 2.500, 5.000 und 10.000 Zellen/Well) evaluiert, um ein Konfluent-werden der Zellen zu verhindern und das Proliferationsverhalten über einen möglichst langen Zeitraum (bis zu 7 Tagen) analysieren zu können. Ausgehend von diesen Versuchen wurden die Zelllinien mit 5.000 (FaDu und HeLa) beziehungsweise 10.000 Zellen (FaDu, Detroit, SCC9, SCC25, HaCaT und L929) pro Well in Fünffachansätzen in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte für die reine Methionin-Restriktion die Stimulation mit methioninfreiem Medium oder Vollmedium. Für die Kombination mit Methionin und/oder Cystein wurden fünf verschiedenen Medien verwendet, was zur Veranschaulichung in Abb. 5 dargestellt ist.

● ● ● ● ●	Originales Vollmedium	● ● ● ● ●
● ● ● ● ●	Methionin+ Cystein+	● ● ● ● ●
● ● ● ● ●	Methionin- Cystein+	● ● ● ● ●
● ● ● ● ●	Methionin+ Cystein-	● ● ● ● ●
● ● ● ● ●	Methionin- Cystein-	● ● ● ● ●

Abb. 5. Versuchsaufbau Methionin-/Cystein-Restriktion. Ausschnitt einer 96-Well-Mikrotiterplatte, wobei (+) für methioninhaltig/cysteininhaltig und (-) für methioninfrei/cysteinfrei steht.

Das Vollmedium sowie das Methionin-/ und Cystein-freie Medium wurde in dieser Zusammensetzung gekauft, die anderen Medien (Met+/Cys+, Met-/Cys+, Met+/Cys-) wurden selbst durch Zugabe der entsprechenden Aminosäuren

zusammengesetzt. Tab. 8 gibt die Cystein-, Cystin- und Methionin-Konzentration der verwendeten Medien an. Statt Cystin wurde ebenfalls Cystein zugegeben.

	Originales Vollmedium	Met+/Cys+	Met-/Cys+	Met+/Cys-	Met-/Cys-
MEM-Alpha FaDu, Detroit562	100 mg/L L-Cysteine	131 mg/L L-Cysteine	131 mg/L L-Cysteine	-	-
	31 mg/L L-Cystine	-	-	-	-
	15 mg/L L-Methionine	15 mg/L L-Methionine	-	15 mg/L L-Methionine	-
DMEM F-12 Mix SCC9, SCC25	17,56 mg/L L-Cysteine	41,56 mg/L L-Cysteine	41,56 mg/L L-Cysteine	-	-
	24 mg/L L-Cystine	-	-	-	-
	17,24 mg/L L-Methionine	17,24 mg/L L-Methionine	-	17,24 mg/L L-Methionine	-
RPMI HeLa, L929	65,2 mg/L L-Cysteine	65,2 mg/L L-Cysteine	65,2 mg/L L-Cysteine	-	-
	15 mg/L L-Methionine	15 mg/L L-Methionine	-	15 mg/L L-Methionine	-
DMEM HaCaT	63 mg/L L-Cysteine	63 mg/L L-Cysteine	63 mg/L L-Cysteine	-	-
	30 mg/L L-Methionine	30 mg/L L-Methionine	-	30 mg/L L-Methionine	-

Tab. 8. Angaben über Cystein-, Cystin- und Methionin-Konzentration der verwendeten Medien.

Da das Proliferationsverhalten unter dem Met+/Cys+ Medium mindestens genauso gut war, wie unter dem originalen Vollmedium, diente dieses als Referenzwert und wurde auf 100 % normiert. Bei der Zelllinie HeLa war es aufgrund des sehr schnellen Wachstums nur möglich, bis zum fünften Tag repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Die Analysen fanden nach 24 h, 48 h, 72 h, 120 h und 168 h mittels der bereits beschriebenen Kristallviolett-Färbung statt.

2.2.2.3 Zytotoxizitätsassay nach Zugabe von Aminosäure-Analoga

Die Zellen wurden mit 10.000 Zellen/Well in Fünffachansätzen in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Am Folgetag erfolgte die Stimulation mit dem im

Medium gelösten Analogon in der entsprechend angegebenen Konzentration. Als Referenzwert diene das normale Vollmedium, das Methionin-freie Medium sowie als zusätzliche Kontrolle das Methionin-haltige und Methionin-freie Medium unter der Zugabe der jeweiligen Lösungsmittel in der gleichen Endkonzentration wie in der entsprechenden Lösung des Analogons (DMSO, Ethanol, HCl, aqua dest. oder Methanol) (siehe auch Abb. 6 und Tab. 9).

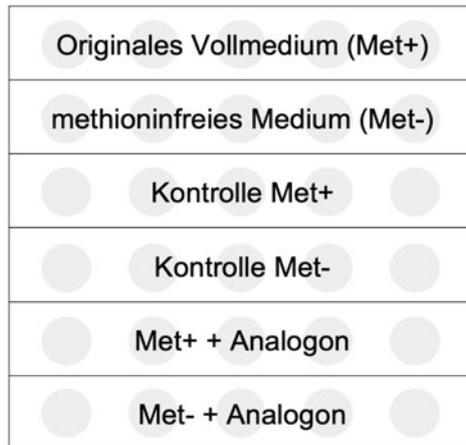


Abb. 6. Versuchsaufbau Aminosäure-Analoga. Ausschnitt einer 96-Well-Mikrotiterplatte, wobei + für Methionin-haltig und - für Methionin-frei steht (eigene Darstellung).

Analogon	gelöst in	Konzentration [g/L]	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [mM]
L-γ-Azidohomoalanin Hydrochlorid	DMSO	60	180,58	≈ 333
Boc-L-Methionin	Ethanol absolut	60	249,33	≈ 241
D-Cystein	1N HCl	60	121,16	≈ 496
D-Ethionin	1N HCl	120	163,24	≈ 735
D-Lysin	aqua dest.	30	146,19	≈ 205
D-Methionin	aqua dest.	30	149,21	≈ 201
F _{moc} -L-Methionin	DMSO	60	371,45	≈ 162
N-Formyl-L-Methionin	Methanol	30	177,22	≈ 169
L-Ethionin	1N HCl	120	163,24	≈ 735
L-Lysin	aqua dest.	30	146,19	≈ 205
Z-DL-β-Homoalanin	DMSO	60	237,25	≈ 253

Tab. 9. Übersicht in welchen Konzentrationen und welchen Chemikalien die Aminosäure-Analoga gelöst wurden.

Die Analoga wurden abhängig von der Löslichkeit in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben (Tab. 10 und Tab. 11). Die Zellquantifizierung fand nach 72 h anhand der bereits beschriebenen Kristallviolett-Färbung statt.

Volumenprozent der Analogalösung zum Medium	Absolute Menge des zugebenen Analogons [mg]	Absolute Methioninmenge im Medium [mg]	x-facher Überschuss zu Methionin (RPMI)
1,25 % der 333mM Lösung L-γ-Azidohomoalanin Hydrochlorid (DMSO)	37,5	0,740625	≈ 50,6
2,5 % der 241mM Lösung Boc-L-Methionin (Ethanol absolut)	75	0,73125	≈ 102,6
1,25 % der 496mM Lösung D-Cystein (1 N HCL)	37,5	0,740625	≈ 50,6
1,25 % der 735mM Lösung D-Ethionin (1 N HCL)	75	0,740625	≈ 101,3
5 % der 205mM Lösung D-Lysin (aqua dest.)	75	0,7125	≈ 105,3
5 % der 162mM Lösung D-Methionin (aqua dest.)	75	0,7125	≈ 105,3
1,25 % der 162mM Lösung Fmoc-L-Methionin (DMSO)	37,5	0,740625	≈ 50,6
5 % der 169mM Lösung N-Formyl-L-Methionin (Methanol)	75	0,7125	≈ 105,3
1,25 % der 735mM Lösung L-Ethionin (1 N HCL)	75	0,740625	≈ 101,3
5 % der 205mM Lösung L-Lysin (aqua dest.)	75	0,7125	≈ 105,3
1,25 % der 253mM Lösung Z-DL-β-Homoalanin (DMSO)	37,5	0,740625	≈ 50,6

Tab. 10. Überschuss der Analoga in Relation zur Methionin-Konzentration im Medium.

	x-facher Überschuss von L-γ-Azidohomoalanin Hydrochlorid	x-facher Überschuss von Fmoc-L-Methionine
MEM-Alpha FaDu, Detroit562	≈ 51,28	≈ 51,28
DMEM F-12 Mix SCC9, SCC25	≈ 44,6	≈ 44,6
RPMI HeLa, L929	≈ 50,6	≈ 50,6
DMEM HaCaT	≈ 25,6	≈ 25,6

Tab. 11. Überschuss der Analoga in Relation zur jeweiligen Methionin-Konzentration im Medium.

2.2.3 Modifizierter Bradford-Assay nach Grintzalis und Georgiou

Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte mittels einer vereinfachten Version des Bradford-Assays (Grintzalis *et al.*, 2015, Georgiou *et al.*, 2008).

Hierfür wurden die Zellen zunächst in großen Petrischalen (Durchmesser ca. 14,5 cm) in 20 ml Vollmedium ausgesät. Für die Bestimmung der Proteinmenge 24 h beziehungsweise 72 h nach Stimulation mit beziehungsweise ohne Methionin wurden zum Startzeitpunkt 1×10^6 Zellen und für die Bestimmung der Proteinmenge nach 120 h zum Startzeitpunkt 5×10^5 Zellen pro Schale verwendet. Nach 24 h, 72 h und 120 h wurden die Zellen mittels Trypsin gelöst, die Zellzahlen per EVE™ viermal pro Probe bestimmt und der Mittelwert gebildet. Durch Zentrifugieren (5 min bei 1200 rpm) und anschließendem Absaugen des Überstandes wurden die erhaltenen Pellets bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Vor der Versuchsdurchführung wurde das Pellet in PBS gelöst (1×10^6 Zellen/ml PBS) und mittels Ultraschall (Branson™ Ultrasonics) homogenisiert. Die Proben wurden 1:10 mit PBS verdünnt in Duplikaten (jeweils 200 μl) auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und anschließend wurden jeweils 50 μl CBB-Reagenz (Verdünnung der 2x CBB-Stammlösung (60 mg CBB und 100 ml 2N HCl) mit 2N HCL) pro Well zugegeben. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau bindet an Proteine. Um auch die absoluten Proteinmengen der Proben anhand einer Standardkurve eines Referenzproteins bestimmen zu können, trägt man zusätzlich eine Log₂ Verdünnungsreihe mit 0 bis 40 $\mu\text{g/ml}$ BSA (Rinderalbumin), ebenfalls gelöst in PBS, auf. Die Absorptionmessung der gebildeten Protein-CBB-Komplexe erfolgte nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) mit dem Mikroplatten-Reader Tecan Infinite F50 sowohl bei 620 nm als auch als Referenzwert bei 450 nm. Die Standardkurve, gebildet aus dem Quotienten der Absorptionmessungen bei 620 und 450 nm, ist für Konzentrationen bis 40 $\mu\text{g/ml}$ BSA nahezu linear.

Datenanalyse:

Zunächst wurden die Daten für die Standardkurve durch Subtraktion des Backgrounds (BG) ermittelt.

$$\frac{MW_{E620(0\mu\text{g BSA})}}{MW_{E450(0\mu\text{g BSA})}} = \text{Background (BG)}$$

Da die Proben in Duplikaten aufgetragen wurden, konnte man zunächst Mittelwerte (MW) für beide Wellenlängen bilden und anhand dieser den gemittelten Quotienten $\frac{MW_{(E620)}}{MW_{(E450)}}$ berechnen. Die Messwerte der stimulierten Zellen

wurden mit denen der Kontrolle in prozentuale Relation gesetzt. Die Messwerte $\frac{MW_{(E620)\text{Kontrolle}}}{MW_{(E450)\text{Kontrolle}}}$ wurden auf 100 % normiert. Die Formel zur Berechnung der

relativen Proteinmenge (%) der stimulierten Zellen lautet:

$$\left(\frac{\frac{MW_{(E620)(\text{stimulierte Zellen})}}{MW_{(E450)(\text{stimulierte Zellen})}}}{\frac{MW_{(E620)\text{Kontrolle}}}{MW_{(E450)\text{Kontrolle}}}} \right) \times 100 = \text{RP (relative Proteinmenge in Prozent)}$$

Die Standardabweichung (STABW) wurde mit Hilfe des Programms Microsoft® Excel errechnet. Die relative Standardabweichung in Prozent wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\left(\frac{\frac{\text{STABW}_{\frac{MW_{(E620)}}{MW_{(E450)(\text{Wert x})}}}}}{\frac{MW_{(E620)}}{MW_{(E450)(\text{Wert x})}}}} \right) \times \text{RP}_{(\text{Wert x})} = \text{STABW}_{(\text{RP})} \text{ in Prozent}$$

Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchsansätzen reproduziert.

2.2.4 WST1-Vitalitäts-Assay

WST1 (water soluble tetrazolium 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) ist ein Stoff zur Bestimmung der metabolischen Aktivität. Der WST-1-Assay beruht auf dem Konzept des Tetrazolium-Assays (Mosmann, 1983). Nur in vitalen Zellen mit intakter Atmungskette können die mitochondrialen Dehydrogenasen Tetrazolium-Salze wie WST1 reduzieren und dunkelrotes Formazan bilden. Die photometrisch erfasste Intensität korreliert mit

der metabolischen Aktivität und somit häufig auch mit der Anzahl lebender Zellen. Die Zellen wurden in Fünffachansätzen in 96-Well-Mikrotiterplatten (10.000 Zellen/Well) ausgesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden sie mit Methionin-haltigen oder Methionin-freiem Medium stimuliert. Nach der Stimulation für einen beziehungsweise fünf Tage wurde zur Messung das WST1 Reagenz mit dem jeweiligen Medium im Verhältnis 2:1 gemischt und 20 µl dieser Lösung zu den Zellen hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit zwischen 15 min und 2,5 h – je nach Zelllinie – wurde die optische Dichte (OD) der WST1-Färbung im Mikroplatten-Reader Tecan Infinite F50 bei 450 nm gemessen.

Datenanalyse:

Die Daten wurden durch Subtraktion des Backgrounds vom Hintergrundsignal der Färbung bereinigt. Der Background der WST1-Färbung wurde individuell für die jeweilige Messung bestimmt. Die Extinktionsmittelwerte (MW) der stimulierten Zellen (Met-) wurden mit den Referenzwerten, also den Extinktionsmittelwerten der Zellen mit dem Vollmedium (Met+) verglichen. Der Referenzmittelwert wurde gleich 100 % gesetzt, die relative Stoffwechselaktivität der stimulierten Zellen konnte dann folgendermaßen berechnet werden:

$$\left(\frac{\text{WST1-MW}_{(\text{Met-})\text{E450}}}{\text{WST1-MW}_{(\text{Met+})\text{E450}}} \right) \times 100 = \text{RS (relative Stoffwechselaktivität in Prozent)}$$

Die Standardabweichung (STABW) wurde mit Hilfe des Programms Microsoft® Excel errechnet. Die relative Standardabweichung in Prozent wurde folgendermaßen berechnet:

$$\left(\frac{\text{STABW}_{\text{Wert x E450}}}{\text{MW}_{\text{Wert x E450}}} \right) \times \text{RS} = \text{STABW}_{(\text{RS})} \text{ in Prozent}$$

2.2.5 Metabolom-Analyse mittels Massenspektrometrie

Die hochauflösende Massenspektrometrie (auch Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS)) diente der Untersuchung des Metaboloms der murinen Zelllinie L929 nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen nach Inkubation mit Vollmedium oder Methionin-freiem Medium. Die Massenspektrometrie

ermöglichte die Analyse von mehr als 150 Metaboliten in einem Messdurchlauf, welche zur besseren Übersicht in Tab. 12 dargestellt sind. Analysiert wurden Metabolite der grundlegenden Stoffwechselwege, wie des Kohlenhydratstoffwechsels, des Citratzyklus und des Harnstoffzyklus, aber unter anderem auch ATP, ADP und NADH.

Aminosäuren	Aminosäurederivate	Harnstoffzyklus
Alanine	Acetylglycine	Carbamoylphosphate
Arginine	Choline	Citrulline
Asparagine	Betaine	ArgSucc
Aspartate	Aminobutyrate	Ornithine
Cysteine	GABA	N-Acetylorithine
Glutamate	Hydroxybutyrate	
Glutamine	Hydroxyproline	
Glycine	Phenylpyruvate	
Histidine	Creatine	Citratzyklus
Isoleucine	Creatinine	Citrate
Leucine	Carnitine	Aconitate
Lysine	Spermidine	a-Ketoglutarate
Methionine	CoA	Succinate
Phenylalanine	3-Methyl-2-oxobutanoate	Fumarate
Proline	3-Methyl-2-oxopentanoate	Malate
Serine	4-Methyl-2-oxopentanoate	
Threonine	5-Hydroxytryptophane	
Tryptophan	3-Hydroxykynurenine	Kohlenhydratstoffwechsel
Tyrosine	Kynurenine	Hexosephosphate
Valine	N-Formylkynurenine	Fructose-1,6-bisphosphate
	Quinolinic Acid	Dihydroxyacetone phosphate
	Serotonine (5-HT)	3-Phosphoglycerate
	Homocysteine	Phosphoenolpyruvate
	Homoserine	Pyruvate
	S-Adenosylhomocysteine	Lactate
	S-Adenosylmethionine	6-Phosphogluconate
	Cystathionine	Gluconate
	Cysteamine	Pentose-5-phosphate
	Cystine	Erythrose-4-phosphate
	GSH	Deoxyribose-phosphate
	GSSG	Glucosamine
	Taurine	Glucosamine-phosphate
		Glycerol-3-phosphate
		N-Acetylneuraminic acid

Lipide
Acetoacetate
Mevalonate
Mevalonate-5-phosphate
Geranylgeranyl-PP
Malonate

Pyrimidine	Purine	Co-Faktoren
Carbamoylaspartate	Inosin	Riboflavine
Dihydroorotate	dInosin	FMN
Orotate	IMP	FMNH ₂
Uracil	Adenin	FAD
Uridin	Adenosin	FADH ₂
UMP	AMP	Nicotinamide
UDP	ADP	Nicotinate
UTP	ATP	NAD ⁺
dUridine	cAMP	NADH
dUMP	dAMP	NADP ⁺
dUDP	dADP	NADPH
dUTP	dATP	Dihydrofolate
UDP-Glc	Guanin	Tetrahydrofolate
UDP-Glucuronate	Guanosin	5-Methyl-THF
Cytosin	GMP	Tetrahydrobiopterin
Cytidin	GDP	Thiamine (+)
CMP	GTP	Thiamine phosphate (+)
CDP	Hypoxanthin	Pantothenate
CTP	Xanthin	Pyridoxine
dCytidine	Xanthosin	
dCMP	Xanthurenic Acid	
dCDP	XMP	
dCTP		
Thymin		
Thymidine		
TMP		
TDP		
TTP		
dThymidine		
dTMP		
dTDP		
dTTP		

Tab. 12. Übersicht aller in der Massenspektrometrie gemessene Metabolite.

Zunächst wurden die Zellen hierfür in 20 ml Kulturmedium in Maxi-Petrischalen (Durchmesser ca. 14,5 cm) ausgesät. Tab. 13 und Tab. 14 zeigen die jeweils verwendeten Zellzahlen der zwei Versuchsserien.

L929	Zellzahl
Tag 1	1 x 10 ⁶ Zellen/20 ml Medium
Tag 2	1 x 10 ⁶ Zellen/20 ml Medium
Tag 3	1 x 10 ⁶ Zellen/20 ml Medium
Tag 4	5 x 10 ⁵ Zellen/20 ml Medium
Tag 5	5 x 10 ⁵ Zellen/20 ml Medium

Tab. 13. Massenspektrometrische Untersuchung – Serie 1 (proliferative Bedingungen).

L929	Zellzahl
Tag 1	3 x 10 ⁶ Zellen/20 ml Medium
Tag 2	3 x 10 ⁶ Zellen/20 ml Medium
Tag 3	3 x 10 ⁶ Zellen/20 ml Medium
Tag 4	3 x 10 ⁶ Zellen/20 ml Medium
Tag 5	3 x 10 ⁶ Zellen/20 ml Medium

Tab. 14. Massenspektrometrische Untersuchung – Serie 2 (konfluente Bedingungen).

Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz mit und ohne Methionin jeweils in Triplets. Nach 24 h Inkubation zur Zelladhäsion erfolgte nach Absaugen des Überstandes durch Zugabe von 20 ml/Schale Vollmedium oder 20 ml/Schale Methionin-freiem Medium die Stimulation. Zur Analyse der Metaboliten im Überstand wurde vor Ende des jeweiligen Versuchstage je 1 ml des Medienüberstandes abgenommen, bevor der restliche Überstand abgesaugt wurde. Anschließend wurde der adhärenente Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und durch die Zugabe von 3 ml der Trypsin-/EDTA-Lösung gelöst. Im Anschluss wurden 7 ml des jeweiligen Mediums hinzugegeben und die absoluten Zellzahlen der Zellsuspensionen mit dem automatisierten Zellzähler EVE™ erfasst. Um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten und Messfehler zu minimieren wurde jede Probe viermal gezählt und der Mittelwert aus den Messergebnissen gebildet. Durch Zentrifugieren (5 min bei 1200 rpm und 21 °C) und Absaugen des Überstandes wurden Zellpellets, die 1 x 10⁶ Zellen enthalten, hergestellt. Es wurden zunächst sowohl die Zellextrakte (intrazellulär, jeweils 1 x 10⁶ Zellen) als auch die zugehörigen Medienüberstände (extrazellulär, jeweils 1 ml) bei -20 °C

eingefroren, bevor die massenspektrometrische Analyse und Auswertung der Primärdaten, wie im Folgenden kurz beschrieben, von Herrn Dr. Werner Schmitz durchgeführt wurden.

Analyse von wasserlöslichen Metaboliten in Zellextrakten und Kulturmedien:

Zellen: Nach der Zugabe von 0,5 ml MeOH/CH₃CN/H₂O (50/30/20, v/v/v) mit 10 µM Lamivudin wurden die Zellpellets durch Ultraschallbehandlung (10*1 s. 250 W Ausgangsenergie) homogenisiert.

Medium: 100 µl Kulturmedium wurden mit 0,4 ml MeOH/CH₃CN (50/30, v/v) mit 10 µM Lamivudin kombiniert.

Allgemeines Verfahren: Die resultierende Suspension wurde zentrifugiert (20 kRCF für 2 min in einer Eppendorf-Zentrifuge 5424) und der Überstand wurde auf eine C18-SPE-Säule aufgetragen, die mit 0,5 ml CH₃CN aktiviert und mit 0,5 ml MeOH/CH₃CN/H₂O (50/30/20, v/v/v) äquilibriert wurde. Das SPE-Eluat wurde in einem Vakuumkonzentrator verdampft. Das resultierende Pellet wurde in 50 µl (Zellextrakte) oder 500 µl (Medienextrakte) von 5 mM NH₄OAc in CH₃CN/(25/75, v/v) gelöst.

LC-Parameter: Die mobile Phase A bestand aus 5 mM NH₄OAc in CH₃CN/H₂O (5/95, v/v) und die mobile Phase B bestand aus 5 mM NH₄OAc in CH₃CN/H₂O (95/5, v/v).

Nach Aufbringen von 3 µl der Probe auf die ZIC-HILIC-Säule (bei 30 °C) lief das LC-Gradientenprogramm wie folgt ab: 100 % Lösungsmittel B für 2 min, lineare Abnahme auf 40 % Lösungsmittel B über 16 min, Beibehaltung bei 40 % Lösungsmittel B für 9 min und Zunahme auf 100 % Lösungsmittel B über 1 min. Die Säule wurde zur Säulenäquilibrierung vor jeder Injektion 5 min lang bei 100 % Lösungsmittel B gehalten. Die Flussrate wurde bei 200 µl/min gehalten. Das Eluat wurde von 1,85 min bis 20,0 min nach der Probeninjektion zur ESI-Quelle der QE-MS geleitet.

Die MS-Parameter waren die folgenden: Scan-Typ, volle MS im positiven und negativen Modus (abwechselnd); Scan-Bereich, 69 - 1000 m/z; Auflösung, 70.000; AGC-Target, 3E6; maximale Injektionszeit, 200 ms; Hüllgas, 30; Hilfsgas, 10; Sweep-Gas, 3; Spray-Spannung, 3. 6 kV (positiver Modus) oder 2,5 kV

(negativer Modus); Kapillartemperatur, 320 °C; S-Linsen-HF-Pegel, 55,0; und Temperatur der Hilfgasheizung, 120 °C.

Anmerkung und Datenauswertung: Die den berechneten monoisotopischen Massen entsprechenden Peaks (MIM +/- H+ \pm 2 mMU) wurden mit Hilfe der TraceFinder-Software (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) integriert.

Materialien: Ultrareines Wasser wurde aus einem Millipore-Wasserreinigungssystem (Milli-Q Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) gewonnen. HPLC-MS-Lösungsmittel, LC-MS NH₄OAc und Lamivudin wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. RP18-SPE-Säulen: 50 mg Strata C18-E (55 μ m) in 1-mL-Röhrchen (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Sonifizierer: Branson Ultrasonics 250 ausgestattet mit einer 13 mm-Disintegrator-Sonotrode (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland).

LC/MS-System: Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 UHPLC-System, ausgestattet mit einem Q Exactive Massenspektrometer (QE-MS), das eine HESI-Sonde beinhaltet (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland). Partikelfilter: Speerfilter mit einer ID von 2,1 mm (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland). UPLC-Vorsäule: SeQuant ZIC-HILIC-Säule (5- μ m Partikel, 20 \times 2 mm) (Merck, Darmstadt, Deutschland). UPLC-Säule: SeQuant ZIC-HILIC-Säule (3,5- μ m Partikel, 100 \times 2,1 mm) (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Rohdatenanalyse und Zahlenwertbildung (in Kurzform):

Die massenspektrometrischen Analysen wurden sowohl unter proliferativen als auch konfluenten Bedingungen, im Folgenden auch als Serie 1 und 2 bezeichnet, in vier voneinander unabhängigen Experimenten jeweils zu 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h durchgeführt, jeder Wert in dreifacher Ausfertigung. Die Metabolite wurden in Zellpellets und entsprechenden Überständen (Medien) unter Methionin-haltigen und Methionin-freien Bedingungen quantifiziert (insgesamt 12 Proben pro Zeitpunkt). Die resultierenden Peakflächen wurden gegen Lamivudin als externen Standard normalisiert. Daraus wurde für jedes Triplikat der Mittelwert einschließlich der Standardabweichung berechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte in Prozent umgerechnet. Bei den Werten der Medien wurde die Kontrollmessung des verwendeten Mediums als 100 %

definiert. Für die Zellpellets wurde der höchste gemessene Wert in jeder Testreihe innerhalb eines Experiments als 100 % definiert. Aus diesen Werten wurden dann die durchschnittlichen Mittelwerte aus den vier Experimenten in den einzelnen Tabellen zusammengefasst. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse auf natürliche Zahlen gerundet und als Heatmap dargestellt. Der entsprechende Farbbereich ist unter jeder Tabelle einzeln angegeben. Alle Werte und die für die einzelnen Tabellen verwendeten Datensätze sind im Anhang (Kapitel 7) beigefügt.

2.2.6 Statistik

Jeder Versuch wurde in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten pro Medium und Zelllinie reproduziert. Die Daten wurden zunächst in Microsoft® Excel (für Mac, Version 16.33) gesammelt und aufbereitet. Die abgebildeten Grafiken wurden dann mit GraphPad Prism (für Windows, Version 8.3.0) erstellt

3 Ergebnisse

3.1 Proliferationsverhalten ausgesuchter Zelllinien unter Aminosäure-Restriktion

Aminosäuren haben eine essentielle Bedeutung für den Körper. Sie sind mit ihren Metaboliten Bestandteil aller bedeutenden Stoffwechselwege und Grundbausteine von Strukturproteinen und Enzymen. Eine Reduktion der verfügbaren Aminosäuren zeigt daher sofort drastische Wirkungen und die Zelle schaltet auf den Low-Energy-Metabolismus um. Auf Grund des geringen Energieniveaus werden in diesem Zustand Prozesse wie Proliferation und Wachstum reduziert beziehungsweise inhibiert.

Selbst die Restriktion einer einzelnen Aminosäure ist ausreichend, um diesen Zustand zu erreichen – die Restriktion der Aminosäure Methionin hat sich hierbei in der Forschung etabliert. Diese Aminosäure zeichnet sich durch eine zentrale und gegenüber den anderen Aminosäuren überragende Stellung aus. Sie ist in der Biosynthese die energieaufwändigste Aminosäure und aus diesem Grund vermutlich auch in fast allen Lebewesen die Start-Aminosäure bei der Proteinsynthese. Eine entsprechend hohe Methionin-Konzentration signalisiert, dass ausreichend Energie verfügbar ist und ermöglicht somit die energieaufwändige Proteinsynthese (Cao *et al.*, 2019). Außerdem ist Methionin durch die Sulfhydrylgruppe wesentlich an schwefel-basierten Stoffwechselfvorgängen beteiligt. So kann aus Methionin und ATP S-Adenosyl-Methionin (SAM) entstehen, dieses kann über weitere Schritte zu der zweiten schwefelhaltigen Aminosäure Cystein umgewandelt werden (siehe auch Abb. 8).

3.1.1 Proliferationsverhalten unter Methionin-Restriktion über einen Zeitraum von sieben Tagen

In ersten Versuchen sollte die Aminosäure-Restriktion in Form der Methionin- sowie der Cystein-Restriktion einzeln und in Kombination auf die Proliferation von HNSCC-Zelllinien (FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25) und auf die humanen Kontrollzelllinien HeLa und HaCaT über einen Zeitraum von sieben Tagen untersucht werden. Da bis dato keine Untersuchungen über die Methionin-Restriktion im Plattenepithelkarzinom vorliegen, sollte *in vitro* untersucht werden, ob sich diese Methode grundsätzlich zur Inhibition der Proliferation und somit zukünftig als Therapieform gegen Krebs eignet.

Bei allen Zelllinien war ein antiproliferativer Effekt durch die Methionin-Restriktion zu erkennen (Abb. 7). Bei der Zelllinie HaCaT führte die Restriktion bereits nach 24 h zu einer signifikanten Inhibition des Wachstums (Abb. 7A). Bei den Zelllinien HeLa und HaCaT nahm die relative Zellzahl über den gesamten Untersuchungszeitraum kontinuierlich ab, mit einem prozentualen Minimum für HaCaT am siebten Tag mit $16,9 \% \pm 2,5 \%$ (Abb. 7A) und für HeLa $31,7 \% \pm 3,5 \%$ am fünften Tag (Abb. 7B).

Auch die Tumorzelllinien sprachen eindeutig auf die Methionin-Restriktion an, allerdings erreichten diese ab dem dritten Tag eine Plateauphase. Die niedrigsten erreichten prozentualen Werte der vier HNSCC-Linien sind für FaDu $62,0 \% \pm 18,5 \%$ am fünften Tag (Abb. 7C), für Detroit562 $58,9 \% \pm 9,8 \%$ ebenfalls am fünften Tag (Abb. 7D), für SCC9 $49,7 \% \pm 9,8 \%$ am siebten Tag (Abb. 7E) sowie für SCC25 $72,0 \% \pm 8,6 \%$ auch am siebten Tag (Abb. 7F).

Bei der Zelllinie SCC9 konnte erst ab dem dritten Tag eine signifikante Inhibition der Proliferation beobachtet werden (Abb. 7E). Ob die unterschiedlichen Zeiträume zum Beispiel auf eine Methionin-Abhängigkeit der Zelllinien zurückzuführen sind, bleibt Bestandteil weiterer Untersuchungen.

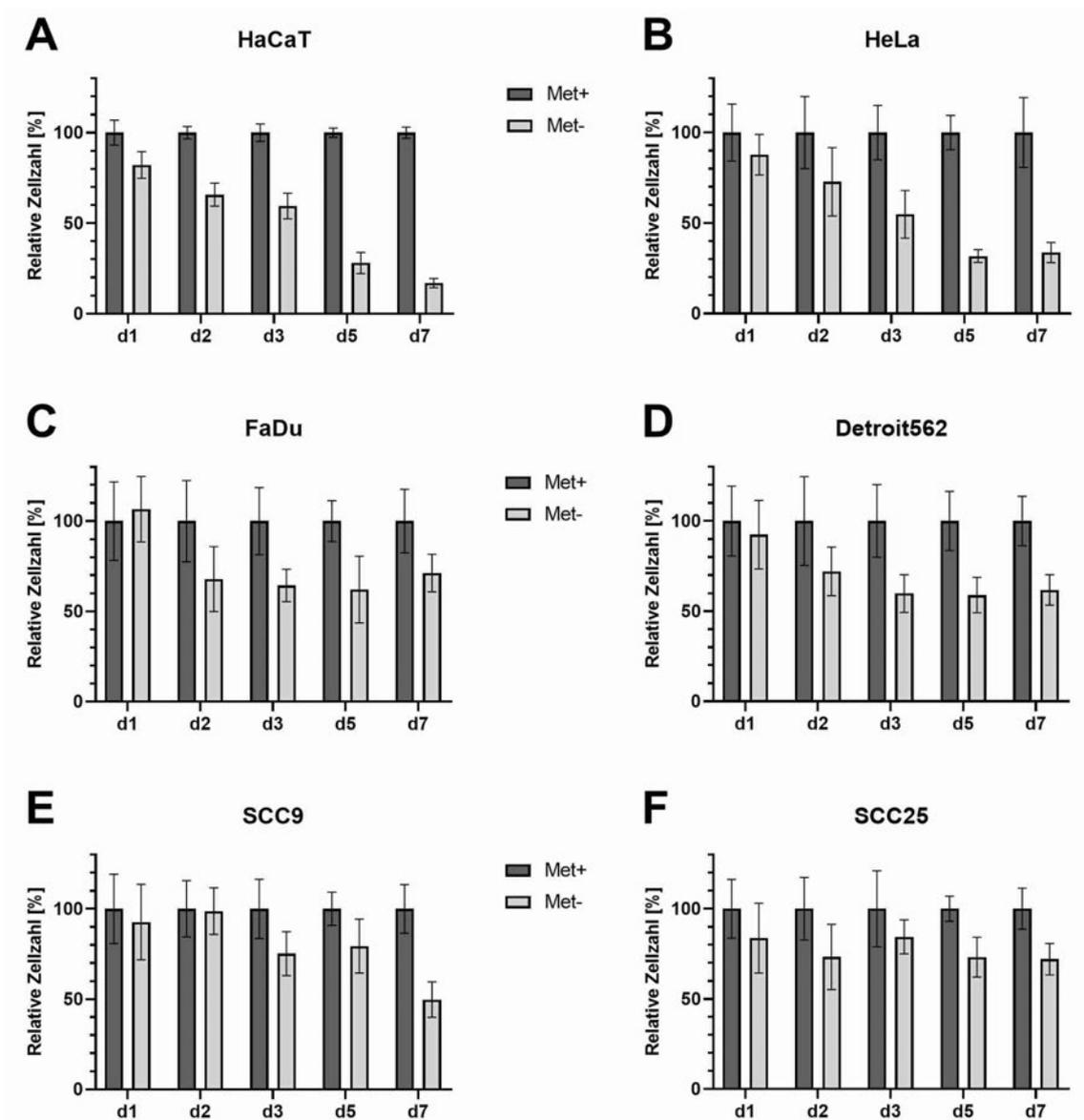


Abb. 7. A-F Proliferationsverhalten der Zelllinien HaCaT, HeLa, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 nach Methionin-Restriktion. Die Proliferation der genannten Zelllinien wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen analysiert. Die Zellen wurden in Fünffachansätzen in einer 96-Well-Platte ausgesät (siehe Material und Methoden). Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Vollmedium oder Methionin-freiem Medium inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der drei Versuche sind in den Abbildungen zusammengefasst.

3.1.2 Proliferationsverhalten unter Methionin-/Cystein-Restriktion über einen Zeitraum von sieben Tagen

In dem vorher beschriebenen Versuch konnte aufgezeigt werden, dass die Methionin-Restriktion in den analysierten Zelllinien ein geeignetes Mittel ist, die Proliferation signifikant zu inhibieren. Der Ansatz der Methionin-Restriktion lässt sich im Labor gut durchführen, allerdings gestaltet sich die Umsetzung als Therapieoption deutlich schwieriger, da man die Methionin-Zufuhr durch eine alleinige Diät mit der Nahrung kaum verhindern kann. Die Aminosäure Cystein wird aus Serin unter der Verwendung von Methionin synthetisiert (Abb. 8).

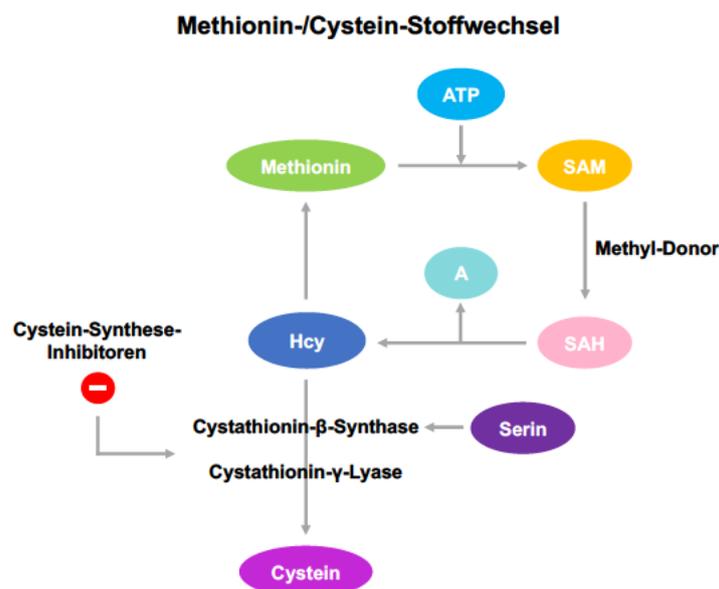


Abb. 8. Übersicht des Methionin-/Cystein-Stoffwechsels. Der Stoffwechsel der beiden schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein steht im engen Zusammenhang. So liefert Methionin das S-Atom der Sulfhydrylgruppe für die Synthese des Cysteins aus Serin. Auch in anderen Stoffwechselprozessen nimmt Methionin eine zentrale Rolle ein. SAM (S-Adenosyl-Methionin) ist hierbei ein Schlüsselprodukt. Es entsteht durch die Reaktion von Methionin mit ATP und fungiert als Methylgruppendonor. SAM kann über S-Adenoysl-Homocystein (SAH) zu Homocystein (Hcy) und Adenosin (A) hydrolysiert werden. Homocystein kann entweder zu Methionin remethyliert werden oder über zwei Syntheseeenzyme zu der Aminosäure Cystein umgebaut werden. Diese Syntheseeenzyme könnten potentielle Angriffspunkte sein, um durch Cystein-Synthese-Inhibitoren evtl. einen Low-Energy-Metabolismus zu induzieren.

Da es in Studien bereits Erfolge bei der Inhibition der beiden für die Cystein-Synthese notwendigen Enzyme, Cystathionin-β-Synthase und Cystathionin-γ-Lyase, gibt, wäre eine Inhibition dieser beiden Enzyme möglicherweise eine andere und einfachere Option einen Low-Energy-Metabolismus zu induzieren, die zudem auch leichter als Therapie umzusetzen wäre (Hellmich *et al.*, 2015).

Aus diesem Grund wurde in weiteren Untersuchungen das Proliferationsverhalten der Zelllinien ebenfalls über sieben Tage unter Cystein-Restriktion analysiert. Um herauszufinden, ob sich der durch Methionin-Restriktion erreichte antiproliferative Effekt durch die Restriktion zweier Aminosäuren verstärkt, wurde zusätzlich die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion untersucht.

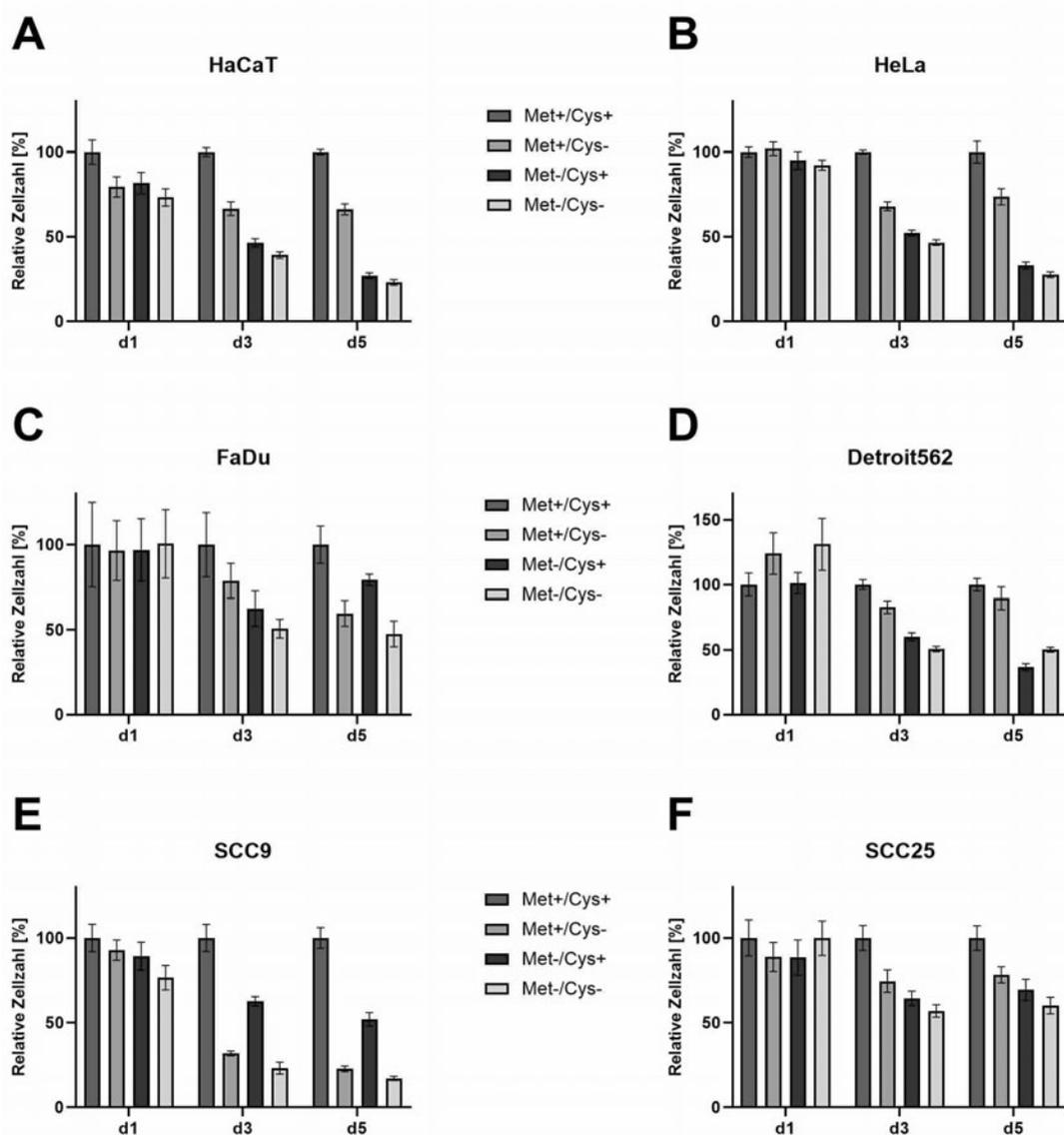


Abb. 9. A-F Proliferationsverhalten der Zelllinien HaCaT, HeLa, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 nach Methionin-/Cystein-Restriktion. Die Proliferation der genannten Zelllinien wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen analysiert. Die Zellen wurden in Fünffachansätzen in einer 96-Well-Platte ausgesät (siehe Material und Methoden). Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin- und/oder Cystein-freiem Medium (Met+/Cys-, Met-/Cys+, Met-/Cys-) oder analog mit Vollmedium (Met+/Cys+) inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der drei Versuche sind in den Abbildungen zusammengefasst.

Der Untersuchungszeitraum der Methionin- oder der Cystein- beziehungsweise der kombinierten Methionin-Cystein-Restriktion betrug sieben Tage. Der besseren Übersichtlichkeit wegen sind die Ergebnisse in der vorherigen Abbildung (Abb. 9) allerdings graphisch nur für Tag eins, drei und fünf dargestellt. Bei allen Zelllinien führte sowohl die alleinige Methionin-Restriktion (Met-/Cys+), die alleinige Cystein-Restriktion (Met+/Cys-) als auch die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion zu einer Inhibition der Zellproliferation (Abb. 9). Abgesehen von den Zelllinien SCC9 (Abb. 9E) und FaDu (Abb. 9C) war der wachstumsinhibierende Effekt durch die alleinige Cystein-Restriktion im Trend nicht ganz so effektiv wie durch die alleinige Methionin-Restriktion. Die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion führte im Vergleich zu der Restriktion einer einzelnen Aminosäure zu einer marginal verstärkten Inhibition der Proliferation.

Eine Ausnahme bildete Detroit562, bei dieser Zelllinie wurde das Wachstum durch die alleinige Methionin-Restriktion am effektivsten inhibiert. Der durch die Methionin-Restriktion erreichte Wert lag für diese Zelllinie am fünften Tag bei 36,6 % (und am nicht dargestellten siebten Tag bei 14,2 %). Durch die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion wurde am fünften Tag eine relative Zellzahlreduktion von 50,1 % (am nicht dargestellten siebten Tag 33,8 %) gemessen (Abb. 9D). Zusätzlich sind zur besseren Übersicht die am fünften Tag erreichten, prozentualen Werte aller analysierten Zellen in folgender Tabelle (Tab. 15) dargestellt.

	Met+/Cys-	Met-/Cys+	Met-/Cys-
HaCaT	66,1 % ± 3,2 %	27,1 % ± 1,7 %	23,1 % ± 1,7 %
HeLa	73,6 % ± 4,8 %	33,1 % ± 2,0 %	27,6 % ± 1,7 %
FaDu	59,6 % ± 7,6 %	79,3 % ± 3,2 %	47,6 % ± 7,5 %
Detroit562	89,5 % ± 8,7 %	36,6 % ± 2,7 %	50,1 % ± 1,9 %
SCC9	22,7 % ± 1,7 %	51,9 % ± 4,0 %	17,1 % ± 1,3 %
SCC25	78,3 % ± 4,8 %	69,4 % ± 6,2 %	60,1 % ± 4,9 %

Tab. 15. Übersicht der relativen Zellzahlen durch Cystein- /Methionin- und kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion nach fünftägiger Stimulation.

3.1.3 Analyse der Zellvitalität unter Methionin-Restriktion

Die Aminosäure-Restriktion mit Methionin führte bei allen analysierten Zellen zu einer signifikant verringerten Zellzahl. Die Zellquantifizierung erfolgte bei den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Versuchen anhand von Kristallviolett-Lebendfärbungen. Kristallviolett ist ein basischer Farbstoff, der sich an die saure DNA der Zellen anlagert. Bei adhärent wachsenden Zellen würden sich tote Zellen in der Regel vom Boden der 96-Well-Platten ablösen, man kann daher davon ausgehen, dass nur vitale Zellen angefärbt und photometrisch ausgewertet werden. Allerdings kann man mit dieser Methode nicht unterscheiden, ob die verringerte Zellzahl durch eine Inhibition der Proliferation oder eine Form des Zelltodes (Apoptose, Nekroptose, Nekrose usw.) verursacht wird. Aus diesem Grund wurden zur Analyse der Zellvitalität weitere Studien durchgeführt.

Zunächst wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen die Morphologie der Zellen unter Methionin-Restriktion beobachtet. Durch die 40x Vergrößerung des Mikroskops sollten auffällige morphologische Veränderungen erkennbar sein. Falls es durch die Methionin-Restriktion zu einem deutlich vermehrten Zelltod kommt, kann man dies in der Regel visuell erkennen. In einem weiteren Versuch wurde die potentielle Toxizität der Methionin-Restriktion mittels ZytoTox-Assays unter konfluenten Bedingungen getestet. Wenn man davon ausgeht, dass eine Methionin-Restriktion per se keine zytotoxische Wirkung hat, sollte der Vergleich von unter Methionin-freiem und unter Vollmedium kultivierten Zellen bei konfluenten Bedingungen nicht zu wesentlichen Unterschieden der Zellzahlen führen. Um die metabolische Aktivität der Zellen unter Methionin-Restriktion zu untersuchen, wurde in einem weiteren experimentellen Ansatz der WST1-Vitalitäts-Assay durchgeführt. Nur vitale Zellen mit intakter Atmungskette können Tetrazolium-Salze wie WST1 durch mitochondriale Dehydrogenasen reduzieren. Sie bilden dabei dunkelrotes Formazan. Nach Zugabe von WST1 zum Kulturmedium kann die Intensität photometrisch bestimmt werden. Diese korreliert mit der metabolischen Aktivität und somit der Vitalität der Zelle.

3.1.3.1 Mikroskopische Analyse der Zellen nach Methionin-Restriktion über einen Zeitraum von fünf Tagen

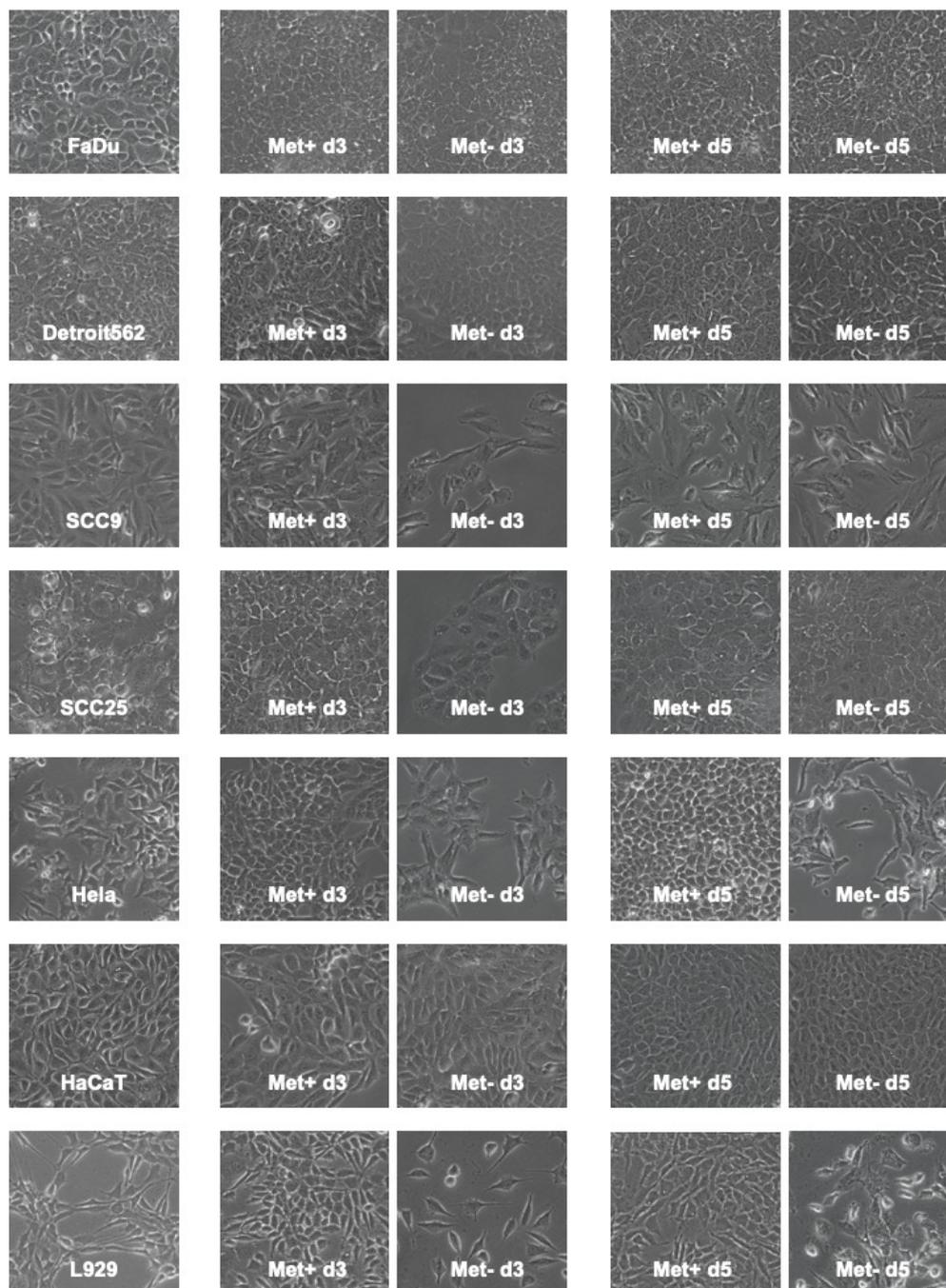


Abb. 10. Mikroskopische Analyse der Zellen unter Methionin-Restriktion (40x Vergrößerung). Die linke Spalte zeigt den noch nicht konfluenten Zellrasen zwei Tage nach dem Passagieren der unbehandelten Zellen (Zellen im jeweiligen Vollmedium in Zellkulturflaschen). Für die Darstellung der Zellen unter Methionin-Restriktion wurden in 6-Well-Platten 10.000 Zellen/Well in 2 ml Vollmedium ausgesät und nach 24 h Inkubation mit Methionin-freiem bzw. Vollmedium stimuliert. In der mittleren Spalte sind die Zellen drei Tage (d3) und in der rechten Spalte fünf Tage (d5) nach Stimulation mit Methionin-freiem Medium/Vollmedium abgebildet. Die jeweiligen abgebildeten Zellen sind nicht repräsentativ für die absoluten Zellzahlen.

Abb. 10 zeigt ausgewählte Fotos der mikroskopischen Analysen der untersuchten Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9, SCC25, HeLa, HaCaT und L929. Links ist jeweils der nicht konfluente Zellrasen zwei Tage nach dem Passagieren in Zellkulturflaschen im jeweiligen Vollmedium abgebildet. Diese Abbildung der unbehandelten Zellen dient als Referenz. In der mittleren Spalte sind Fotos der Zellen drei Tage und in der rechten Spalte fünf Tage nach Stimulation mit Methionin-freiem beziehungsweise Vollmedium abgebildet. Bei der mikroskopischen Analyse der verwendeten Zelllinien ließen sich keine relevanten morphologischen Veränderungen der Zellen unter Methionin-Restriktion erkennen, die auf einen schlechten physiologischen Zustand oder gar eine Form des Zelltodes hindeuten. Die Zellen haben einen grundsätzlich normalen und vitalen Eindruck gemacht.

3.1.3.2 ZytoTox unter konfluenten Bedingungen

Da die mikroskopische Analyse rein optisch ist, aber keine quantitative Aussage über die Zellzahl zulässt, wurde in einem weiteren Versuch analysiert, ob die Methionin-Restriktion die Zellproliferation inhibiert oder, ob der Zelltod in irgendeiner Form wesentlichen Einfluss auf die Zellzahl hat.

Dazu wurden 96-Well-Platten mit 10.000 bis 100.000 Zellen/Well in Sechsfachansätzen ausgesät. In einem Vorversuch fand nach 24 h eine Quantifizierung der Zellen mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung statt, um die ungefähre Zellzahl zu bestimmen, bei der ein Well konfluent gewachsen ist (Abb. 11A-G, jeweils linke Grafik, absolute Extinktionswerte proportional zur absoluten Zellzahl). Im zweiten Teil des Versuches wurden ebenfalls 10.000-100.000 Zellen/Well entweder mit Methionin-freiem oder Vollmedium in Triplikaten inkubiert. Die Auswertung und Analyse erfolgten, wie bereits beschrieben, an Tag eins, drei und fünf. Zur besseren Übersicht sind in Abb. 11 (A-G, jeweils rechte Grafik) nur die Ergebnisse für Tag drei dargestellt.

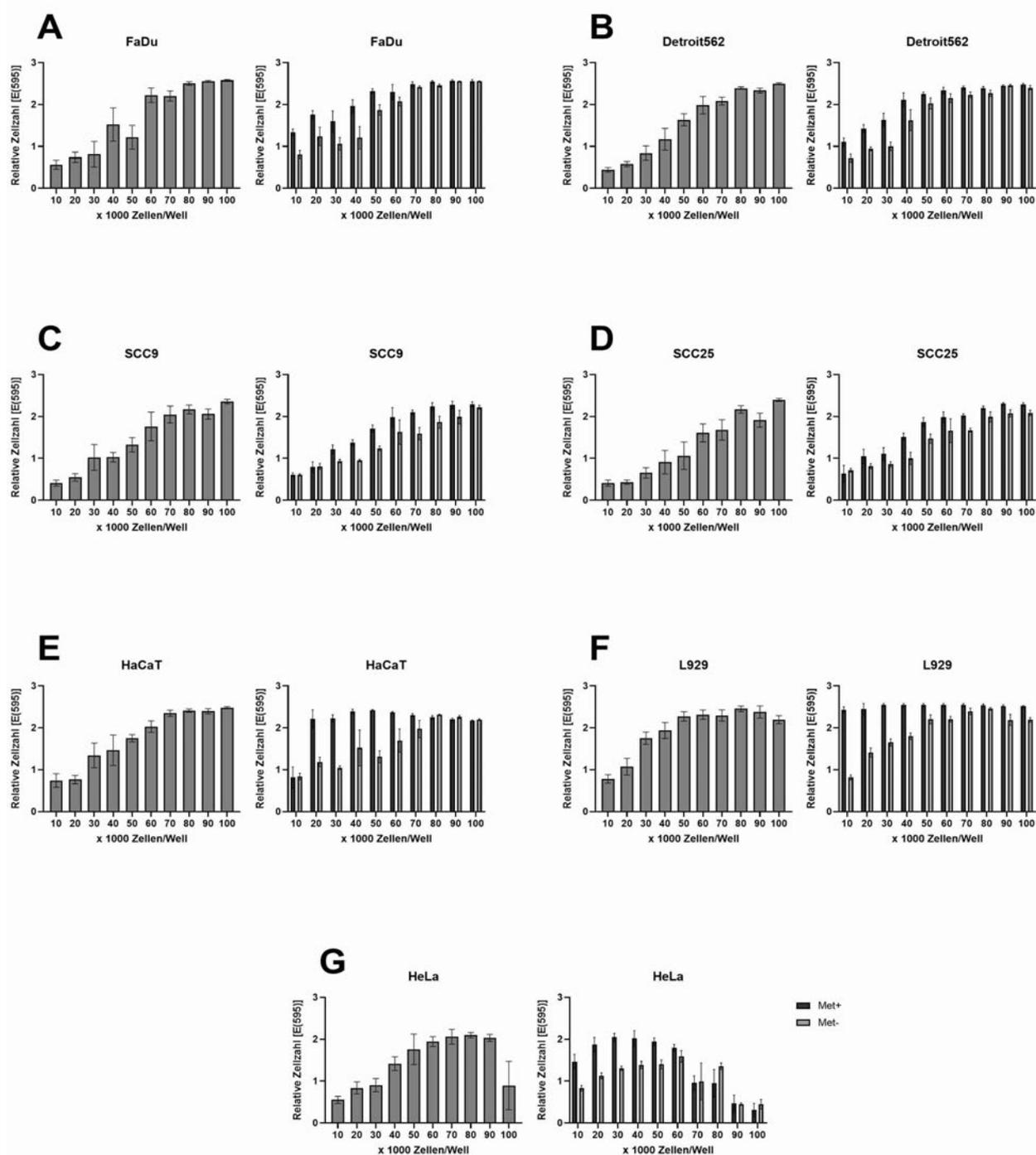


Abb. 11. A-G ZytoTox unter Methionin-Restriktion und konfluenten Bedingungen der Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25, HaCaT, L929 und HeLa. Es wurden für jede Zelllinie vier 96-Well-Platten mit jeweils 10.000 bis 100.000 Zellen/Well ausgesät. Nach 24 h fand eine Quantifizierung der Zellen mittels Kristallviolett-Färbung statt (jeweils linke Abbildung). Die Zellen wurden danach in Triplikaten entweder mit Methionin-freiem oder Vollmedium inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 24 h, 72 h und 120 h mittels der Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der drei Versuche für den 72 h Wert sind in den Abbildungen zusammengefasst.

Nach 24 h war bei allen Zelllinien im Mittel spätestens ab 70.000 Zellen/Well eine Sättigung der Extinktionswerte/Zellzahl zu erkennen (Abb. 11, linke Grafik). Ausnahme war die Zelllinie HeLa. Hier war eine Quantifizierung bis maximal 90.000 Zellen/Well möglich. Das Waschen der Platten nach der Kristallviolett-Färbung führte bei 100.000 Zellen/Well aufgrund des sehr schnellen Wachstums bereits nach 24 h zu einem Ablösen/Abplatzen der Proben. Zu den späteren Zeitpunkten waren auch Konzentrationen unter 90.000 Zellen/Well von diesem Phänomen betroffen (Abb. 11G (links)).

In den rechten Abbildungen erkennt man, dass solange der Zellrasen nicht konfluent ist, die Zellen unter Vollmedium stärker proliferieren, beziehungsweise unter Methionin-Restriktion die Proliferation inhibiert ist. Orientiert man sich jeweils an den Werten (Zellzahl/Well) in den linken Abbildungen, bei denen die Konfluenz nahezu erreicht ist und vergleicht ab diesem Wert die Ergebnisse in den rechten Abbildungen, erkennt man, dass die relative Zellzahl unter beiden Bedingungen nahezu identisch ist. Unter Methionin-freien Bedingungen kann die Zellzahl bis zu 10 % geringer sein, was entweder auf eine verlangsamte Proliferation zurückzuführen ist, da die Zellen auch unter fast konfluenten Bedingungen immer noch etwas proliferieren können, oder im schlechtesten Fall auf einen Zelltod mit einem maximalen Wert von 10 %.

3.1.3.3 WST1-Vitalitäts-Assays unter Methionin-Restriktion

Zusätzlich wurde die metabolische Aktivität der Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9, SCC25, HeLa, HaCaT und L929 anhand von WST1-Vitalitäts-Assays unter Methionin-Restriktion nach einem und fünf Tagen analysiert, was in der folgenden Abbildung dargestellt ist (Abb. 12).

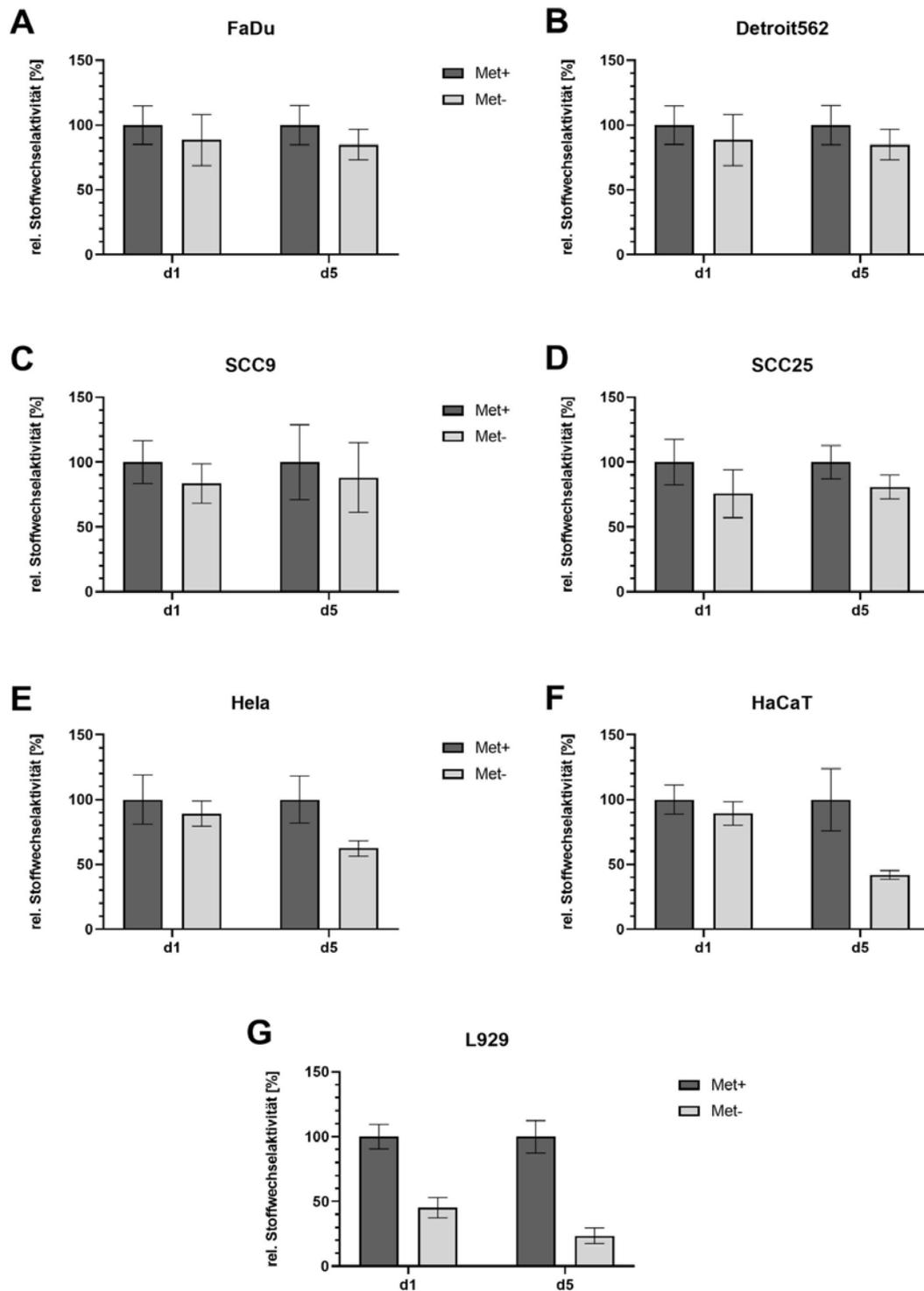


Abb. 12. A-G WST1-Assay nach Methionin-Restriktion der Zelllinie FaDu, Detroit562, SCC9, SCC25, HeLa, HaCaT und L929. Es wurden jeweils 10.000 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Nach einem bzw. fünf Tagen wurde durch Zugabe von WST1 die relative Stoffwechselaktivität gemessen. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der drei Versuche sind in den Abbildungen zusammengefasst.

An beiden Messzeitpunkten war bei allen untersuchten Zelllinien, mit und ohne Restriktion, eine eindeutige Vitalität festzustellen. Die photometrische Intensitätsveränderung beruht auf der Reduktion von WST1 zu dunkelrotem Formazan, welche nur in vitalen Zellen mit intakter Atmungskette durch mitochondriale Dehydrogenasen erfolgen kann, sie korreliert also mit der Stoffwechselaktivität (siehe auch Kapitel 2.2.5).

Dass die gemessene relative Stoffwechselaktivität bei allen untersuchten Zelllinien unter Methionin-Restriktion geringer war als ohne Restriktion, lässt sich wahrscheinlich auf die entsprechend geringere Zellzahl durch die Methionin-Restriktion zurückführen. Dies bestätigt somit auch die Ergebnisse zum Proliferationsverhalten unter Methionin-Restriktion (siehe Kapitel 3.1.1).

3.2 L929 als murines Modellsystem der Methionin-Restriktion

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Modellsystems, welches die schnelle Analyse der Aminosäure-Restriktion auf molekularer und metaboler Ebene ermöglicht, um zum Beispiel mögliche Therapeutika beziehungsweise die schon erwähnten Caloric Restriction Mimetics im Bereich des Low-Energy-Metabolismus zu analysieren.

Aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Doktorarbeit Sebastian Gubik, 2018/19, Arbeit zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht publiziert) war bekannt, dass die Proliferation der Zelllinie L929 sehr gut durch eine Methionin-Restriktion inhibiert werden konnte. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine murine Fibroblastenzelllinie. Murine und Fibroblasten allgemein zeichnen sich durch einen wesentlich höheren und schnelleren Stoffwechsel aus, was nicht nur hinsichtlich der Proliferation, sondern auch auf Ebene des Metabolismus zu einer besseren und schnelleren Signifikanz der Versuchsergebnisse führen kann. Außerdem wird durch die Untersuchung des murinen Systems eine Vergleichbarkeit der eigenen Ergebnisse mit den Daten der Literatur ermöglicht, da die bisher publizierten Experimente im Bereich des Low-Energy-Metabolismus und der Methionin-Restriktion vor allem an Mäusen und Ratten durchgeführt wurden.

Der Einfluss der Aminosäure-Restriktion in Form der Methionin- sowie der Cystein-Restriktion auf die Proliferation sollte, neben den bereits beschriebenen vier HNSCC-Linien (FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25) und den als Kontrolle verwendeten humanen Zelllinien HeLa und HaCaT, zusätzlich an der murinen Fibroblastenzelllinie L929 über einen Zeitraum von sieben Tagen untersucht werden.

Da die Aminosäure Methionin als Start-Aminosäure bei der Proteinbiosynthese genutzt wird, sollte zusätzlich die Gesamtproteinmenge in L929 mittels eines modifizierten Bradford-Assay unter Methionin-Restriktion über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert werden.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie sollten L929-Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen alle 24 h auf ihr metabolisches Profil unter Methionin-Restriktion analysiert werden, um einen charakteristischen metabolischen Fingerabdruck des Low-Energy-Metabolismus identifizieren zu können. Um Referenzwerte sowohl für die metastasierende als auch die stagnierende/etablierte Situation des Tumors auf der Ebene des Metabolismus zu erhalten (bzw. zu simulieren), sollten die Zellen sowohl unter proliferierenden wie nicht proliferierenden Bedingungen analysiert werden.

3.2.1 Proliferationsverhalten der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion über einen Zeitraum von sieben Tagen

In dem Kapitel 3.1.1. wurde das Proliferationsverhalten der vier HNSCC-Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 sowie der beiden Kontrollzelllinien HeLa und HaCaT unter Methionin-Restriktion über einen Zeitraum von sieben Tagen bereits analysiert.

Bei allen Zelllinien zeigte sich eine signifikante Inhibition der Proliferation durch die Methionin-Restriktion. Auch die HNSCC-Linien zeigten ein eindeutiges Ansprechen auf die Methionin-Restriktion (Abb. 13A, rote Linie). Allerdings war der inhibierende Effekt auf die Kontrollzelllinien HeLa und HaCaT vor allem am fünften und siebten Tag deutlich effektiver (Abb. 13A, orange Linie).

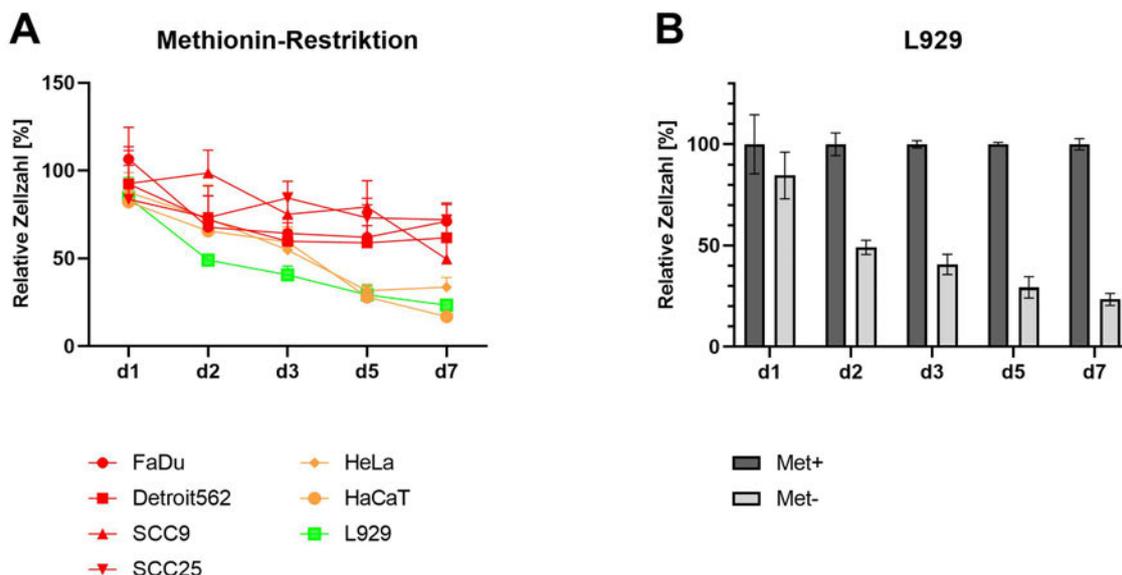


Abb. 13. A und B Übersicht des Proliferationsverhalten der Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9, SCC25, HeLa, HaCaT und L929 unter Methionin-Restriktion. A) Übersicht des Proliferationsverhaltens der Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9, SCC25, HeLa, HaCaT und L929 unter Methionin-Restriktion über sieben Tage. Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1. und 3.2.1 in einem Graphen. Zur besseren Kenntlichkeit sind die Ergebnisse der Tumorzelllinien rot, der humanen Kontrollzelllinien orange und der murinen Zelllinie L929 grün dargestellt. **B)** Die Ergebnisse der Proliferationsanalyse der Zelllinie L929 aus Abb. A zur besseren Darstellung als Balkendiagramm. Für A und B gilt: die Zellen wurden in Fünffachansätzen in einer 96-Well-Platte ausgesät (siehe Material und Methoden). Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Vollmedium oder Methionin-freiem Medium inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der drei Versuche sind in den Abbildungen zusammengefasst.

In Abb. 13A (grüne Linie) und 13B ist zusätzlich zu den bereits beschriebenen Zelllinien das Proliferationsverhalten der murinen Fibroblastenzelllinie L929 unter Methionin-Restriktion über einen Zeitraum von sieben Tagen zusammengefasst dargestellt. Der niedrigste erreichte, prozentuale Wert dieser Zelllinie lag bei $23,4 \% \pm 3,0 \%$, gemessen am siebten Tag. Nach 48 h war die Proliferation bereits zu ca. 50 % inhibiert und zeigte auch an den darauffolgenden Zeitpunkten einen kontinuierlichen Rückgang (Abb. 13B).

Eine Inhibition der Proliferation um 50 % durch die Methionin-Restriktion konnte bei den Kontrollzelllinien HeLa und HaCaT ebenfalls festgestellt werden, allerdings erst nach 120 h. Bei diesen beiden Zelllinien waren die tiefsten erreichten, prozentualen Werte für HaCaT am siebten Tag $16,9 \% \pm 2,5 \%$ und für HeLa $31,7 \% \pm 3,5 \%$ am fünften Tag (Abb. 13A, orange Linie). Die niedrigsten

erreichten, prozentualen Werte der vier HNSCC-Linien lagen im Schnitt bei 60,65 % \pm 11,7 % (FaDu 62,0 % \pm 18,5 % am fünften Tag, Detroit562 58,9 % \pm 9,8 % ebenfalls fünfter Tag, SCC9 49,7 % \pm 9,8 % am siebten Tag und SCC25 72,0 % \pm 8,6 % auch am siebten Tag (Abb. 13A, rote Linie)).

Bei Betrachtung der vier HNSCC-Linien ließ sich nur bei der Zelllinie SCC9 und bei dieser auch erst am siebten Tag eine Inhibition des Wachstums um 50 % feststellen. Im Gegensatz zu den humanen Zelllinien konnten durch die Methionin-Restriktion bei der murinen Zelllinie L929 frühere und signifikantere Unterschiede bei der Inhibition der Proliferation aufgezeigt werden. Diese Zelllinie ist also grundsätzlich besser für ein Modellsystem geeignet als die anderen in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien.

3.2.2 Proliferationsverhalten der Zelllinie L929 unter Methionin-/Cystein-Restriktion über einen Zeitraum von sieben Tagen

Aufgrund der engen Relation des Methionin- und Cystein-Stoffwechsels wurde, wie für die vier HNSCC-Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 sowie für die beiden Kontrollzelllinien HeLa und HaCaT bereits beschrieben, das Proliferationsverhalten der murinen Fibroblastenzelllinie L929 zusätzlich zur Methionin-Restriktion unter Cystein- und unter kombinierter Methionin-/Cystein-Restriktion ebenfalls über einen Zeitraum von sieben Tagen analysiert.

Bei den Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9, SCC25, HeLa und HaCaT führte sowohl die Methionin-, die Cystein- als auch die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation. Allerdings führte die Methionin-Restriktion im Trend zu einer etwas stärkeren Inhibition als die Cystein-Restriktion. Die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion verstärkte den antiproliferativen Effekt marginal im Vergleich zu den beiden Monotherapien (siehe Abb. 9). In der folgenden Abbildung (Abb. 14) ist das Proliferationsverhalten der murinen Zelllinie L929 unter Methionin-/Cystein-Restriktion dargestellt. Die Proliferation wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen analysiert. Der besseren Übersichtlichkeit wegen sind die Ergebnisse allerdings nur für Tag eins, drei und fünf dargestellt.

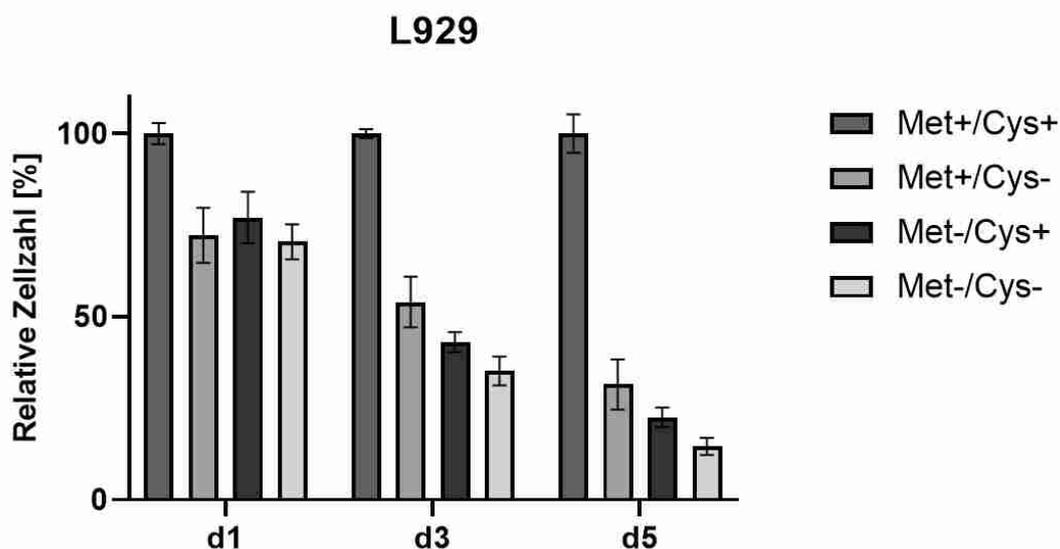


Abb. 14. Proliferationsverhalten der murinen Zelllinie L929 nach Methionin-/Cystein-Restriktion. Die Proliferation der murinen Zelllinie wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen analysiert. Es wurden 10.000 Zellen/Well in Fünffachansätzen in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin- und/oder Cystein-freiem Medium (Met+/Cys-, Met-/Cys+, Met-/Cys-) oder mit Vollmedium (Met+/Cys+) inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der drei Versuche sind in den Abbildungen zusammengefasst.

Auch bei dieser Zelllinie zeigte sich sowohl durch die Methionin-, die Cystein- als auch durch die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion ein antiproliferativer Effekt. Die wachstumshemmende Wirkung durch die Cystein-Restriktion war, zumindest ab Tag drei, nicht ganz so effektiv wie die durch die Methionin- oder die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion. Die Cystein-Restriktion führte am dritten Tag zu einer relativen Zellzahl von $54,9 \% \pm 6,9 \%$, die Methionin-Restriktion und die kombinierte Restriktion führten bereits am dritten Tag zu einer Inhibition des Wachstums um mehr als 50 %. Am fünften Tag wurden durch die Methionin-Restriktion $22,5 \% \pm 2,6 \%$ und durch die Cystein-Restriktion $31,5 \% \pm 6,8 \%$ als prozentuale Werte erreicht. Die kombinierte Restriktion führte im Vergleich zur Restriktion einer einzelnen Aminosäure zu einer geringen Verstärkung des antiproliferativen Effekts mit einer relativen Zellzahl von $14,5 \% \pm 2,3 \%$, gemessen am fünften Tag.

3.2.3 Einfluss der Methionin-Restriktion auf die Gesamtproteinmenge der Zelllinie L929 über einen Zeitraum von fünf Tagen

Methionin wird bei fast allen Lebewesen bei der Proteinbiosynthese durch das Startcodon AUG codiert und als erste Aminosäure eingebaut. Dieses Start-Methionin wird durch posttranslationale Modifikationen häufig verändert oder entfernt. Da Methionin für die Proteinbiosynthese eine essentielle Bedeutung hat, könnte man annehmen, dass sich eine Methionin-Restriktion auf die Proteinbiosynthese auswirkt und so zu einer Inhibition/Senkung führt. Daher wurde in einem ersten Versuchsansatz der Einfluss der Methionin-Restriktion auf die Gesamtproteinmenge in L929 über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels eines modifizierten Bradford-Assays analysiert.

In der folgenden Abbildung (Abb. 15) sind die relativen Proteinmengen der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion gemessen an Tag eins, drei und fünf dargestellt.

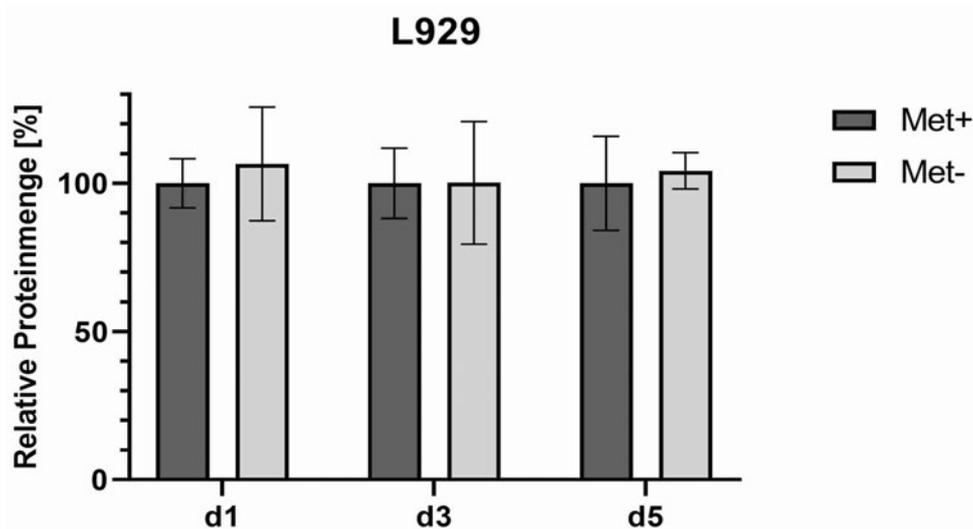


Abb. 15. Bestimmung der Gesamtproteinmenge der murinen Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion über fünf Tage mittels modifiziertem Bradford-Assay. Die Gesamtproteinmenge der murinen Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden entsprechende Zellzahlen in großen Petrischalen ausgesät (siehe Material und Methoden). Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Nach 24 h, 72 h oder 120 h wurden Zellpellets (jeweils normiert auf 1×10^6 Zellen) gebildet. Die Auswertung und Quantifizierung der Proteinmenge erfolgten mittels des modifizierten Bradford Assay und durch die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der vier Versuche sind in den Abbildungen zusammengefasst.

Eine Methionin-Restriktion führte bei dieser Zelllinie über einen Zeitraum von fünf Tagen zu keiner signifikanten Veränderung der Gesamtproteinmenge. Nach fünf Tagen Methionin-Restriktion beträgt die relative Proteinmenge (gemessen an der Proteinmenge der Zellen inkubiert mit Vollmedium) $104,2 \% \pm 6,2 \%$. Die Proteinmenge der Zellen inkubiert mit Vollmedium wurde als Referenzwert gleich 100% gesetzt, die Standardabweichung für die relative Proteinmenge am fünften Tag beträgt $\pm 15,8 \%$. Abb. 15 zeigt, dass die Proteinmenge sich auf Grund der Methionin-Restriktion nicht drastisch ändert. Allerdings ist die Methode auf Grund der Höhe der Standardabweichung nicht exakt genug, um Änderungen im einstelligen Prozentbereich zu bestimmen. Dennoch konnte aufgezeigt werden, dass der Gesamtproteingehalt bei der analysierten Zelllinie L929 selbst nach fünf Tagen Methionin-Restriktion um nicht mehr als den größtmöglichen Fehler von $\pm 15,8 \%$ abweicht.

3.2.4 Massenspektrometrische Untersuchung des Metabolismus der murinen Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion über einen Zeitraum von fünf Tagen

In weiterführenden Versuchen erfolgte die Analyse des Metabolismus der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion mittels Massenspektrometrie. Ziel dieser Versuche war es, ein metaboles Profil zu erstellen, das für die Methionin-Restriktion und im besten Fall auch für einen Low-Energy-Metabolismus charakteristisch ist und im Grunde eine Art metabolischen Fingerabdruck als Ergebnis liefert.

Die in diesen Experimenten genutzte hochauflösende Massenspektrometrie (LC/MS) ermöglichte die Analyse von mehr als 150 wasserlöslichen Metaboliten in einem Messdurchlauf. Analysiert wurden Metabolite der grundlegenden Stoffwechselwege wie des Kohlenhydratstoffwechsels, des Citratzyklus und des Harnstoffzyklus, aber unter anderem auch ATP, ADP und NADH (siehe auch Tab. 12).

Alle 24 h wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen jeweils die Zellextrakte (intrazellulär) sowie die zugehörigen Medienüberstände (extrazellulär) gemessen. Um sowohl die metastasierende als auch die stagnierende/etablierte

Situation eines „Tumors“ zu simulieren, wurden die L929-Zellen sowohl unter proliferierenden wie nicht proliferierenden Bedingungen analysiert. Die Analyse erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. Werner Schmitz, der die Messungen sowie die Auswertung der primären Daten durchführte. Der besseren Übersicht wegen sind im folgenden Kapitel nur ausgesuchte, besonders aussagekräftige Ergebnisse in Form einer Heatmap dargestellt.

Die vollständigen Gesamtübersichten der Ergebnisse sind im Appendix in Kapitel 7.1. (für proliferative Bedingungen) und 7.2. (für konfluente Bedingungen) abgebildet.

3.2.4.1 Massenspektrometrische Untersuchung der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen

Die Methionin-Restriktion führte unter proliferativen Bedingungen zu grundlegenden Veränderungen des Metabolismus der murinen Zelllinie L929 bei bedeutenden Stoffwechselwegen wie dem Kohlenhydratstoffwechsels, dem Citratzyklus und dem Harnstoffzyklus. Um Rückschlüsse auf die Stoffwechsellage der Zellen unter Methionin-Restriktion ziehen zu können, ist neben der relativen Konzentration einzelner Moleküle auch die Summe der relativen Massen aller untersuchten Metabolite eines Stoffwechselweges von Bedeutung. Zum besseren Verständnis sind im Folgenden die Ergebnisse in Prozent angegeben. Bei den Medien wurde das jeweilige Ausgangsmedium vor Versuchsbeginn für Voll- und Methionin-freies Medium als 100 % gesetzt. Da für die intrazellulären Messungen kein Startwert (0 h) vorlag, wurde in diesem Fall zur Darstellung des jeweiligen Trends der jeweils höchste gemittelte Messwert einer Zeitreihe für jeden Metaboliten unabhängig als 100 % gesetzt. Die Heatmap Skalierung der einzelnen gebildeten Gruppe kann unterschiedlich sein. Der jeweils genutzte Skalierungsbereich ist jeweils in den Farben Tiefblau über Weiß bis hin zu Tiefrot unter den einzelnen Tabellen abgebildet.

In einer ersten Analyse (Abb. 16) sind die summierten relativen Massen der Aminosäuren (ohne Methionin), des Citratzyklus (TCA-Zyklus), des Harnstoffzyklus (Urea-Cycle), der Kohlenhydrate, der Pyrimidine und Purine sowohl im Medienüberstand (Abb. 16A) als auch in den Zellextrakten (Abb. 16B) dargestellt.

Metabolites	Media					Cells				
	24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acids	92	94	82	80	72	105	111	116	118	114
Urea Cycle	86	87	101	117	108	73	100	117	139	137
TCA Cycle	147	141	163	178	210	129	137	151	153	173
Carbohydrates	232	395	475	570	645	225	257	274	304	427
Pyrimidines	94	117	139	138	161	106	121	150	157	160
Purines	52	62	67	72	82	54	61	81	91	142

50	75	100	150	250	350	450	550	600	645
----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

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

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

Abb. 16. A und B Übersicht einzelner Stoffwechselgruppen der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen. Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden 5×10^5 beziehungsweise 1×10^6 Zellen (siehe auch Material und Methoden) L929 in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Methionin-frei in Tripletts. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst bei jeder Schale 1 ml Medium zur Analyse abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets jeweils auf 1×10^6 Zellen geeicht gebildet. Die Zellextrakte sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mit der hochauflösenden Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und die Werte gemittelt. In dieser Abbildung ist eine Übersicht der gemessenen Metabolite der extrazellulären Medienüberstände (A) und der intrazellulären Zellextrakte (B) unter proliferativen Bedingungen dargestellt.

Trotz ähnlicher „Trends“ sind vor allem bei den Aminosäuren und den Purinen deutliche Unterschiede des Metabolismus unter Methionin-Restriktion zu sehen. Am auffälligsten ist die unter Methionin-Restriktion kontinuierlich verringerte intrazelluläre Menge an Aminosäuren (von 83 % auf 65 %) bei einer gleichzeitig erhöhten Sekretion von Aminosäuren ins Medium (und einem Anstieg von 105 % auf 114 %). Genau den entgegengesetzten Mechanismus erkennt man bei den Zellen unter Vollmedium. Hier steigt die intrazelluläre Konzentration (von 82 % auf 100 %) an Aminosäuren, während sie extrazellulär mit der Zeit (von 92 % auf 72 %) abnimmt.

Markante Unterschiede sind auch bei der Analyse des Purinstoffwechsels festzustellen. Unter Methionin-Restriktion stieg der Purinspiegel im Vergleich zu der Kontrolle im Medium deutlicher an (von 54 % auf 142 %), während aber der intrazelluläre Spiegel deutlich sank (von 95 % auf 61 %).

Dieses Prinzip beziehungsweise dieser Reaktionstyp, dass die Konzentrationsänderungen innerhalb einer Versuchsgruppe (zum Beispiel unter Methionin-freien Konditionen) jeweils intra- und extrazellulär genau gegensätzlich verlaufen und im Vergleich zu der Kontrolle sich diese Verhältnisse dann wieder genau umkehren, konnte bei einer Vielzahl an Molekülen beobachtet werden. Beispiele, die später näher beschrieben werden sind Spermidin, Kreatin, Kreatinin, Cholin, Homocystein, NADPH, usw. Genau diese Moleküle sind potentielle Marker für die Methionin-Restriktion und bestenfalls auch für den Low-Energy-Metabolismus.

Die in der vorherigen Abbildung (Abb. 16) bereits dargestellten Stoffwechselgruppen lassen sich in weitere Untergruppen einteilen. Von besonderer Bedeutung sind z.B. essentielle und verzweigtkettige Typen von Aminosäuren, die "S"-haltigen Aminosäurederivate aber auch verschiedene Kohlenhydrat-Untergruppen (siehe Abb. 17).

Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Class	Compound										
Amino Acids	total	82	99	90	99	100	83	72	64	72	65
	essential	77	100	87	95	95	80	75	62	72	66
	branched chain	79	100	87	94	91	86	82	72	83	76
Amino Acid Derivatives	total	93	92	83	96	94	98	100	90	88	73
	branched chain	61	92	79	100	75	65	61	44	51	46
	Trp-Metabs	100	83	50	62	58	76	67	51	57	45
	"S"-containing	71	84	83	89	100	34	34	40	41	44
Urea Cycle	total	78	100	90	98	87	87	79	66	78	75
TCA Cycle	total	66	98	88	100	77	68	82	62	74	62
Carbohydrate Metabolites	total	76	100	75	92	73	79	86	73	75	65
	total (w/o Pyr+Lact)	77	80	77	71	62	69	79	86	100	86
	KHs	75	82	79	80	69	72	89	83	100	97
	Hexoses	56	76	67	62	52	55	75	79	100	92
	Pentoses	90	85	87	94	83	86	100	85	95	100
Lipids	total	71	83	74	73	69	69	85	87	100	96
Pyrimidines	total	100	81	68	89	68	98	81	60	67	46
	Intermediates	76	96	83	93	100	82	100	78	98	85
	Nucleinbases	100	97	99	100	98	82	92	73	56	39
	Nucleosides	100	82	64	84	61	99	82	57	69	42
	Nucleotides	99	78	64	88	64	100	77	60	68	50
Purines	total	95	82	88	96	100	95	83	84	80	61
	Intermediates	80	79	88	88	100	79	76	85	75	59
	Nucleinbases	100	61	58	76	51	85	42	39	44	33
	Nucleosides	100	46	53	89	72	100	57	39	64	41
	Nucleotides	65	74	66	82	75	71	100	87	88	65
Co-Factors	RedOx-Factors	85	56	60	79	79	100	78	80	80	25
	Folic Acid Derivatives	52	100	72	76	60	65	81	52	67	44
	Vitamins	89	100	83	87	92	87	94	79	84	68

<40	40	45	50	55	60	70	80	90	100
-----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

Abb. 17. Übersicht der zusammengefassten Metabolite in einzelnen Stoffwechselgruppen der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen. Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden 5×10^5 beziehungsweise 1×10^6 Zellen (siehe auch Material und Methoden) L929 in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Methionin-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst bei jeder Schale 1 ml Medium zur Analyse abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets jeweils auf 1×10^6 Zellen geeicht gebildet. Die Zellextrakte sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mit der hochauflösenden Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und dann zusammengefasst. In dieser Abbildung ist eine Übersicht der gemessenen Metabolite der intrazellulären Zellextrakte unter proliferativen Bedingungen dargestellt.

Der Aminosäuregehalt nahm unter Methionin-freien Bedingungen für essentielle (von 80 % auf 66 %) und verzweigtkettige Typen (von 86 % auf 76 %) ab. Unter der Gruppe der Aminosäurederivate ist die "S"-haltige Gruppe von größtem Interesse. Das Fehlen einer Schwefelquelle aus Methionin verringert die Menge an "S"-haltigen Metaboliten bereits nach 24 h. Erstaunlicherweise bleibt die Menge über einen Zeitraum von 5 Tagen zwischen 34 % und 44 % erhalten, die Zelle legt also großen Wert auf den Schutz dieser wertvollen Ressource. Zusätzlich zeigen die verschiedenen Kohlenhydrat-Untergruppen, dass die Zellen unter Methionin-Restriktion Kohlenhydrate als Energiequelle zu akkumulieren scheinen. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch im Anstieg der Menge an intrazellulärer UDP-Glukose wider (Abb. 21), dem Ausgangsmolekül der Glykogensynthese. Ein weiterer Marker für den Low-Energy-Metabolismus ist ein starker Anstieg der intrazellulären Lipidspeicherung (von 69 % auf 96 %), die im Vergleich dazu unter Kontrollbedingungen nahezu unverändert bleibt (71 % nach 24 h und 69 % nach 120 h). Im Gegensatz dazu zeigte der Nukleotid-Stoffwechsel für Pyrimidine und Purine unter Methionin-freien Bedingungen eine stärkere Abnahme der Nukleinbasen, Nukleoside und Nukleotide. Ein weiterer starker Indikator für den Energiestoffwechsel sind die RedOx-Faktoren, die an Tag 5 unter Methionin-Restriktion auf 25 % abfallen.

Um die Einflüsse auf den Stoffwechsel besser beschreiben zu können, wurde die große Anzahl an gemessenen Daten zur besseren Übersicht und Darstellung der Ergebnisse in folgende Gruppen (A-E) zusammengefasst:

- (A) Aminosäuren (proteinogen)
- (B) Aminosäuren (nicht-proteinogen) und Aminosäurederivate
- (C) „Direkt Methionin/Cystein abhängige Metabolite“
- (D) „Indirekt Methionin/Cystein abhängige Metabolite“ und
- (E) Energiewährungen.

(A) Aminosäuren (proteinogen)

A Media		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acids	Alanine	228	388	478	505	414	159	249	306	291	314
	Arginine	87	97	99	99	93	95	100	104	101	89
	Asparagine	108	113	114	112	97	114	122	129	130	126
	Aspartate	104	118	119	123	124	115	128	137	137	133
	Cysteine	145	129	120	114	98	150	137	131	128	121
	Glutamate	132	178	226	232	274	142	184	217	220	239
	Glutamine	83	67	38	27	21	105	99	94	95	93
	Glycine	136	209	292	338	494	149	223	273	274	309
	Proline	109	98	86	87	78	119	128	137	137	134
	Serine	74	41	20	24	28	81	68	64	76	78
	Histidine	111	113	99	100	92	126	139	150	156	151
	Isoleucine	79	68	50	44	20	90	89	93	98	101
	Leucine	87	77	50	43	18	106	104	112	126	128
	Lysine	74	70	57	55	47	84	84	78	77	64
	Phenylalanine	98	87	58	56	34	120	134	150	163	175
	Threonine	81	79	68	71	54	93	101	111	117	117
	Tryptophan	84	72	49	44	26	107	115	126	132	143
	Tyrosine	82	77	66	63	52	99	105	112	114	125
	Valine	96	102	100	102	94	110	121	128	134	132

50 60 70 80 100 110 120 130 140 150

B Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acids	Alanine	66	84	88	98	100	56	43	34	29	27
	Arginine	80	93	92	87	91	83	94	89	98	100
	Asparagine	80	98	85	94	100	74	43	33	39	35
	Aspartate	100	78	57	77	69	89	59	49	56	40
	Cysteine	77	81	87	91	100	82	63	72	85	80
	Glutamate	95	85	99	97	100	75	68	62	62	47
	Glutamine	47	70	81	93	100	59	56	73	84	81
	Glycine	87	93	83	95	100	87	68	53	52	44
	Proline	96	100	79	91	90	94	61	52	55	41
	Serine	66	62	81	100	92	58	44	44	56	54
	Histidine	75	100	85	97	97	80	70	53	63	55
	Isoleucine	79	100	81	85	80	84	81	69	80	76
	Leucine	70	100	87	95	91	84	82	69	80	70
	Lysine	63	70	78	73	72	66	79	88	96	100
	Phenylalanine	75	100	91	100	100	82	80	65	74	67
	Threonine	80	93	89	95	100	73	67	54	64	64
	Tryptophan	66	100	79	90	90	74	70	55	63	56
	Tyrosine	83	100	86	89	88	90	92	81	91	93
	Valine	86	100	93	100	101	90	85	78	87	83

20 25 30 40 50 60 70 80 90 100

Abb. 18. A und B Relative Mengen der proteinogenen Aminosäuren unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen in der Zelllinie L929. Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden 5×10^5 bzw. 1×10^6 Zellen (siehe Material und Methoden) L929 in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Methionin-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde bei jeder Schale 1 ml Medium abgenommen, dann wurden Zellpellets (geeicht auf 1×10^6 Zellen) gebildet. Die Zellextrakte sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und abschließend zusammengefasst. Der Übersicht wegen sind in dieser Abbildung die gemittelten Ergebnisse der proteinogenen Aminosäuren gemessen in **A**) den Medienüberständen (extrazellulär) sowie in **B**) den Zellextrakten (intrazellulär) dargestellt.

Wie bereits beschrieben nahm die Konzentration der meisten Aminosäuren durch Methionin-Restriktion extrazellulär zu (Abb. 18A) und intrazellulär ab (Abb. 18B). Ausnahmen waren neben Arginin, Lysin und Tyrosin, deren Konzentration durch die Methionin-Restriktion intrazellulär im Gegensatz zur Kontrolle anstieg, Glutamin, Valin und Cystein, deren Konzentration intrazellulär im Vergleich zur Kontrolle leicht zunahm (Abb. 18A).

(B) Aminosäuren (nicht-proteinogen) und Aminosäurederivate

Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Urea Cycle	Carbamoylphosphate	49	80	72	100	70	64	45	18	32	29
	Citrulline	52	60	100	67	56	51	60	82	74	81
	ArgSucc	76	78	79	75	69	78	79	93	98	100
	Ornithine	72	100	72	79	90	79	70	58	74	66
	N-Acetylorithine	86	100	92	93	91	91	92	83	91	84
		15	25	30	40	50	60	70	80	90	100

Abb. 19. Relative Mengen der nicht-proteinogenen Aminosäuren und Aminosäurederivate unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen in der Zelllinie L929. Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden 5×10^5 beziehungsweise 1×10^6 Zellen (siehe auch Material und Methoden) L929 in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Methionin-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst bei jeder Schale 1 ml Medium abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets jeweils geeicht auf 1×10^6 Zellen gebildet. Die Zellextrakte sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und abschließen zusammengefasst. Der besseren Übersicht wegen sind in dieser Abbildung die gemittelten Ergebnisse der nicht-proteinogenen Aminosäuren und der Aminosäurederivate dargestellt.

Der intrazelluläre Gehalt von Carbamoylphosphat ist durch die Methionin-Restriktion stark gesunken (von 64 % auf 29 %) und unter Kontrollbedingungen (von 49 % auf 100 %) deutlich gestiegen. Der zelluläre Gehalt der nicht-proteinogenen Aminosäuren Citrullin und Arginosuccinat, welche beide Metabolite des Harnstoffzyklus sind, nahm unter Methionin-Restriktion leicht zu. Die intrazelluläre Konzentration von Ornithin und N-Acetyl-Ornithin veränderte sich durch die Methionin-Restriktion kaum (Abb. 19).

(C) „Direkt Methionin/Cystein abhängige Metabolite“

Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acid Derivatives	GSH	59	100	27	70	56	50	57	73	65	55
	GSSG	16	27	33	62	100	20	17	18	17	11
	Homocysteine	61	79	74	82	100	58	29	20	30	27
	Homoserine	62	100	70	94	97	91	91	71	96	77
	SAM	62	100	68	84	76	72	80	57	70	64
	S-AdHom	82	100	85	87	87	88	92	80	90	92
	Creatine	52	68	68	100	96	66	66	52	53	40
	Creatinine	35	30	26	29	28	53	95	96	100	90
	Carnitine	77	100	63	92	75	69	57	37	59	23
	Spermidine	95	94	90	100	98	92	78	66	57	39

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

Abb. 20. Relative Mengen der „direkt Methionin/Cystein abhängige Metabolite“ unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen in der Zelllinie L929. Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden 5×10^5 beziehungsweise 1×10^6 Zellen (siehe auch Material und Methoden) L929 in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Methionin-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst bei jeder Schale 1 ml Medium abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets jeweils geeicht auf 1×10^6 Zellen gebildet. Die Zellextrakte sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und abschließend zusammengefasst. Der besseren Übersicht wegen sind in dieser Abbildung die gemittelten Ergebnisse der „direkt Methionin/Cystein abhängigen Metabolite“ dargestellt.

Wie bereits erwähnt steht der Stoffwechsel der Aminosäuren Cystein und Methionin im engen Zusammenhang. Cystein kann über SAM, S-Adenosylhomocystein und Homocystein aus Methionin synthetisiert/regeneriert werden (Abb. 8). Metabolite, bei denen Methionin (oder Cystein) an der Synthese beteiligt ist, sind in Abb. 20 dargestellt.

Die Mengen an Glutathiondisulfid (GSSG) – einem Disulfid aus zwei Glutathionmolekülen – Homocystein, Homoserin, S-Adenosylhomocystein (S-AdHom), Kreatin, Carnitin und Spermidin nehmen in den ersten 5 Tagen der Methionin-Restriktion signifikant ab. Spermidin ist ein Zwischenprodukt, welches bei der Spermin-Synthese aus Putrescin und decarboxyliertem SAM entsteht. Über den Syntheseweg steht Spermidin zum einen im engen Zusammenhang mit SAM, welches wie bereits erwähnt aus Methionin und ATP gebildet wird, und mit Ornithin, dem Vorläufer von Putrescin. Ornithin ist auch, wie die bereits erwähnten Moleküle Citrullin und Argininosuccinat, ein Metabolit des Harnstoffzyklus. Im Harnstoffzyklus entsteht Ornithin aus Arginin und wird zu Citrullin verstoffwechselt.

Der Gehalt an Glutathion (GSH) – einem Tripeptid, bestehend aus Glutamat, Cystein und Glycin – nimmt sowohl unter methioninreichen als auch unter Methionin-freien Bedingungen ab, wobei der GSH-Gehalt unter Methionin-freien Bedingungen signifikant niedriger ist. Ausnahmen sind die beiden Produkte S-Adosylmethionin (SAM) und Kreatinin, die unter Methionin-freien Bedingungen einen kontinuierlichen Anstieg aufweisen. Für die Kreatin-Synthese wird neben den Aminosäuren Arginin und Glycin auch SAM (und für dessen Synthese Methionin) benötigt. Kreatin ist in Form von Kreatinphosphat ein wichtiger Energieträger und auch bei der Synthese von ATP aus ADP von Bedeutung. Die intrazelluläre Konzentration an Kreatinin, einem harnpflichtigen Stoff, der unter anderem beim Aminosäureabbau entsteht, nahm durch die Methionin-Restriktion zu (Abb. 20).

(D) „Indirekt Methionin/Cystein abhängige Metabolite“

Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
	Acetoacetate	65	77	66	65	61	61	81	85	100	97
	Pantothenate	63	84	79	100	94	48	37	36	41	37
	UDP-Glc	53	77	35	17	12	58	84	69	100	92

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

Abb. 21. Relative Mengen der „indirekt Methionin/Cystein abhängige Metabolite“ unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen in der Zelllinie L929. Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden 5×10^5 beziehungsweise 1×10^6 Zellen (siehe auch Material und Methoden) L929 in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Methionin-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst bei jeder Schale 1 ml Medium abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets jeweils geeicht auf 1×10^6 Zellen gebildet. Die Zellextrakte sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Der besseren Übersicht wegen sind in dieser Abbildung die gemittelten Ergebnisse der „indirekt Methionin/Cystein abhängigen Metabolite“ dargestellt.

Auffällig ist der kontinuierliche Anstieg von Acetoacetat und UDP-Glukose sowie der extrem niedrige Gehalt an Pantothensäure unter Methionin-freien Bedingungen, da deren Produkte nicht direkt von Methionin abhängig sind, aber unter Methionin-Restriktion signifikante Unterschiede aufweisen (Abb. 21). Acetoacetat ist ein Ketokörper, der unter anderem beim verstärkten Lipidstoffwechsel entsteht. Die Konzentrationen an Hydroxybutyrat, einem Ketokörper, der durch die NADH-abhängige D- β -Hydroxybutyratdehydrogenase aus Acetoacetat gebildet wird, und Aceton, welches durch spontane Decarboxylierung aus Acetoacetat entstehen kann, nahmen bei Restriktion hingegen ab (in der Abbildung nicht gezeigt).

(E) Energiewährungen

Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
		0	10	20	35	50	60	70	80	90	100
Co-Factors	ADP	100	41	29	22	10	49	0	1	4	3
	ATP	100	89	61	49	23	47	13	7	6	7
	GDP	80	80	89	89	100	81	77	87	77	61
	GTP	81	88	89	89	97	78	81	100	91	87
	NAD+	64	41	35	62	75	100	87	52	94	23
	NADH	97	58	73	91	92	100	86	82	75	34
	NADP+	48	57	39	87	97	71	56	25	100	30
	NADPH	77	80	81	91	100	76	90	75	76	62

Abb. 22. Relative Mengen der Energiewährungen unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen in der Zelllinie L929. Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden 5×10^5 beziehungsweise 1×10^6 Zellen (siehe auch Material und Methoden) L929 in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Methionin-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst bei jeder Schale 1 ml Medium abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets jeweils geeicht auf 1×10^6 Zellen gebildet. Die Zellextrakte sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Der besseren Übersicht wegen sind in dieser Abbildung die gemittelten Ergebnisse der Energiewährungen dargestellt.

Das niedrige zelluläre Energielevel, hervorgerufen durch die Methionin-Restriktion, wurde insbesondere an Molekülen wie ADP, ATP, NAD⁺, NADH, NADP⁺ und NADPH deutlich. Ein Mangel an Energie (z. B. ATP und ADP) ist unter Methionin-freien Bedingungen insbesondere an Tag 5 zu beobachten. Auffallend ist, dass für NAD⁺, NADH, NADP⁺ und NADPH das genaue Gegenteil festgestellt wurde. Unter Methionin-freien Bedingungen steigt die Synthese während der ersten beiden Tage an und nimmt dann ab, während die Synthese unter Vollmediumbedingungen während der ersten 5 Tage kontinuierlich ansteigt (Abb. 22).

3.2.4.1.1 Metaboler Fingerabdruck der Methionin-Restriktion nach 48 h in L929

Das Ziel dieser Versuche war es, ein charakteristisches Stoffwechselprofil der L929-Zellen zu identifizieren, im Prinzip einen metabolen Fingerabdruck. Dieser soll künftig die schnelle und einfache Analyse und Identifizierung von potentiellen Caloric Restriction Mimetics (CRMs) durch einfachen Vergleich eines neuen Stoffwechselprofils von L929-Zellen mit dem in dieser Studie definierten Fingerabdruck des Low-Energy-Metabolismus unter Methionin-Restriktion ermöglichen. Anhand der Anzahl der Übereinstimmungen kann das Potential einzelner Wirkstoffe analysiert und bewertet werden. Abb. 23 zeigt eine Zusammenfassung der massenspektrometrischen Ergebnisse für intrazelluläre Metaboliten unter Methionin-Restriktion nach 48 h. Die Heatmap zeigt deutlich, dass bereits nach 48 h ein spezifisches Profil – ein metaboler Fingerabdruck – definiert werden kann und dass viele der dargestellten Metaboliten zu diesem Zeitpunkt in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Der Fingerabdruck wird mit der Zeit immer spezifischer und genauer, da sowohl der Unterschied in den Mengen der Moleküle als auch die Anzahl der Metaboliten, die sich unterscheiden, unter Methionin-Restriktion zunehmen.

Bestimmte Komponenten eignen sich einzeln oder in Kombination für das "Fast Tracking", eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung eines Low-Energy-Metabolismus. Massenspektrometrische Analysen erfordern einen gewissen Zeit- und Kostenaufwand und nicht jedes Labor kann diese Methode zu jeder Zeit durchführen. Neben dem großen Fingerabdruck mit zahlreichen Metaboliten kann die Induktion eines Low-Energy-Metabolismus potentiell auch mit einem kleinen Footprint, d.h. anhand von ausgewählten Metaboliten und alternativen Messmethoden (wie ELISA oder enzymatischen Assays) analysiert werden. Zum jetzigen Zeitpunkt scheint die Kombination aus Acetoacetat, Kreatin, Spermidin, GSSG und dem Verhältnis von ADP/ATP besonders geeignet zu sein, um in den L929-Zellen das Vorliegen eines Low-Energy-Metabolismus zu bestimmen. Sowohl die intrazellulären als auch die extrazellulären Spiegel aller Komponenten nehmen über einen Zeitraum von 5 Tagen spezifisch zu oder ab, so dass diese Komponenten durch eine Analyse des Überstandes leicht gewonnen und bestimmt werden können. Für alle

Komponenten stehen einfache kommerzielle Kits zur Verfügung, auch Acetoacetat und Kreatinin können oft kostengünstig über die klinische Chemie bestimmt werden. Weitere Metabolite, die zur besseren Bestimmung mit einbezogen werden können, sind die Pantothensäure, UDP-Glukose und die im Medium sezernierten Aminosäuren.

Cells		48h Met(+)	48h Met(-)	Cells		48h Met(+)	48h Met(-)	
Amino Acids	Alanine	84	43	Amino Acid Derivatives	GSH	100	57	
	Arginine	93	94		GSSG	27	17	
	Asparagine	98	43		Homocysteine	79	29	
	Aspartate	78	59		Homoserine	100	91	
	Cysteine	81	63		SAM	100	80	
	Glutamate	85	68		S-AdHom	100	92	
	Glutamine	70	56		Creatine	68	66	
	Glycine	93	68		Creatinine	30	95	
	Proline	100	61		Carnitine	100	57	
	Serine	62	44		Spermidine	94	78	
	Histidine	100	70		Co-Factors	Acetoacetate	77	81
	Isoleucine	100	81			Pantothenate	84	37
	Leucine	100	82			UDP-Glc	77	84
	Lysine	70	79		ADP	41	0	
	Phenylalanine	100	80		ATP	89	13	
	Threonine	93	67		GDP	80	77	
	Tryptophan	100	70		GTP	88	81	
Tyrosine	100	92	NAD+	41	87			
Valine	100	85	NADH	58	86			
Urea Cycle	Carbamoylphosphate	80	45	NADP+	57	56		
	Citrulline	60	60	NADPH	80	90		
	ArgSucc	78	79					
	Ornithine	100	70					
	N-Acetylornithine	100	92					

Abb. 23. Metabolischer Fingerabdruck der Zelllinie L929 nach 48 h Methionin-Restriktion.

Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden 5×10^5 beziehungsweise 1×10^6 Zellen (siehe auch Material und Methoden) L929 in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Methionin-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst bei jeder Schale 1 ml Medium abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets jeweils geeicht auf 1×10^6 Zellen gebildet. Die Zellextrakte sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Dargestellt ist in dieser Abbildung das metabolische Profil des Methionin-Restriktion induzierten Low-Energy-Metabolismus nach 48 h. Zur besseren Übersicht wurden die Metabolite in folgende Gruppen eingeteilt: Aminosäuren, Metabolite des Harnstoffzyklus, Aminosäurederivate, indirekt Methionin/Cystein abhängige Metabolite und Energiewährungen.

3.2.4.2 Massenspektrometrische Untersuchung der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion und konfluenten (nicht-proliferativen) Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen

Da die Methionin-Restriktion auf Ebene des Metabolismus der murinen Zelllinie L929 unter proliferativen Bedingungen stark reflektiert wurde (Kapitel 3.2.4.1) und um neben der proliferierend auch für die stagnierende/etablierte Situation der Zelllinie Referenzwerte erheben zu können, wurden die L929-Zellen in einer zweiten Serie zusätzlich unter Methionin-Restriktion bei konfluenten (nicht-proliferativen) Bedingungen massenspektrometrisch analysiert.

Die Ergebnisse sind im Folgenden ebenfalls in Prozent angeben und die Berechnung erfolgte wie bereits im Vorherigen beschrieben (Kapitel 3.2.4.1). Die Methionin-Restriktion führte sowohl unter proliferativen wie auch konfluenten Bedingungen zu grundlegenden Veränderungen des Metabolismus der murinen Zelllinie L929 bei bedeutenden Stoffwechselwegen, wie dem Kohlenhydratstoffwechsels, dem Citratzyklus und dem Harnstoffzyklus.

Zellen, die nicht proliferieren, könnten theoretisch ebenfalls in einen Low-Energy-Metabolismus gehen. Anhand der folgenden Abbildungen (Abb. 24, Abb. 25, Abb. 26) wird allerdings deutlich, dass die beiden Systeme (konfluent und proliferativ) unter Methionin-Restriktion mehr oder minder gleich reagieren. Was bedeutet, dass die Methionin-Restriktion wiederum einen Low-Energy-Metabolismus induziert, während die Zellen unter Vollmedium auch nach der Kontaktinhibition auf metaboler Ebene permanent für die nächste Teilung in Bereitschaft bleiben. Der Low-Energy-Metabolismus ist also ein spezieller Metabolismus, der unter proliferativen wie auch konfluenten Bedingungen induziert werden kann.

Im Vorherigen wurde der Aminosäuregehalt unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen (wie in Abb. 18 dargestellt) bereits ausführlich beschrieben. Die folgende Abbildung (Abb. 24) zeigt die relativen Mengen der proteinogenen Aminosäuren unter Methionin-Restriktion im Vergleich zwischen proliferativen (Abb. 24A und C) und konfluenten (Abb. 24B und D) Bedingungen, sowohl im Medienüberstand (extrazellulär) (Abb. 24A und B) als auch in den Zellextrakten (intrazellulär) (Abb. 24C und D).

Serie I: Proliferativ

A Media		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acids	Alanine	228	388	478	505	414	159	249	306	291	314
	Arginine	87	97	99	99	93	95	100	104	101	89
	Asparagine	108	113	114	112	97	114	122	129	130	126
	Aspartate	104	118	119	123	124	115	128	137	137	133
	Cysteine	145	129	120	114	98	150	137	131	128	121
	Glutamate	132	178	226	232	274	142	184	217	220	239
	Glutamine	83	67	38	27	21	105	99	94	95	93
	Glycine	136	209	292	338	494	149	223	273	274	309
	Proline	109	98	86	87	78	119	128	137	137	134
	Serine	74	41	20	24	28	81	68	64	76	78
	Histidine	111	113	99	100	92	126	139	150	156	151
	Isoleucine	79	68	50	44	20	90	89	93	98	101
	Leucine	87	77	50	43	18	106	104	112	126	128
	Lysine	74	70	57	55	47	84	84	78	77	64
	Phenylalanine	98	87	58	56	34	120	134	150	163	175
	Threonine	81	79	68	71	54	93	101	111	117	117
	Tryptophan	84	72	49	44	26	107	115	126	132	143
Tyrosine	82	77	66	63	52	99	105	112	114	125	
Valine	96	102	100	102	94	110	121	128	134	132	

Serie II: Konfluent

B Media		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acids	Alanine	35	57	46	29	23	37	50	58	69	79
	Arginine	34	63	67	67	61	79	87	90	89	87
	Asparagine	43	59	58	44	34	86	92	95	101	101
	Aspartate	31	37	39	39	36	39	44	48	51	46
	Cysteine	51	57	52	49	45	58	51	49	50	49
	Glutamate	34	50	61	68	74	41	52	60	67	64
	Glutamine	107	65	16	17	20	110	101	93	89	83
	Glycine	17	32	60	77	90	21	30	37	44	46
	Proline	31	31	26	20	17	37	41	40	43	40
	Serine	18	10	11	9	9	25	19	19	22	25
	Histidine	17	19	18	17	18	22	25	27	30	31
	Isoleucine	49	35	11	5	4	56	56	55	58	54
	Leucine	37	23	7	3	3	43	48	49	55	50
	Lysine	15	24	22	21	19	25	27	27	26	30
	Phenylalanine	28	19	12	8	9	31	38	41	46	45
	Threonine	16	18	18	14	12	22	24	26	29	30
	Tryptophan	225	139	78	44	30	90	135	139	155	137
Tyrosine	57	45	40	37	34	61	68	76	83	84	
Valine	46	45	42	43	44	51	57	62	68	68	

C Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acids	Alanine	66	84	88	98	100	56	43	34	29	27
	Arginine	80	93	92	87	91	83	94	89	98	100
	Asparagine	80	98	85	94	100	74	43	33	39	35
	Aspartate	100	78	57	77	69	89	59	49	56	40
	Cysteine	77	81	87	91	100	82	63	72	85	80
	Glutamate	95	85	99	97	100	75	68	62	62	47
	Glutamine	47	70	81	93	100	59	56	73	84	81
	Glycine	87	93	83	95	100	87	68	53	52	44
	Proline	96	100	79	91	90	94	61	52	55	41
	Serine	66	62	81	100	92	58	44	44	56	54
	Methionine	78	98	91	93	100	16	19	20	19	21
	Histidine	75	100	85	97	97	80	70	53	63	55
	Isoleucine	79	100	81	85	80	84	81	69	80	76
	Leucine	70	100	87	95	91	84	82	69	80	70
	Lysine	63	70	78	73	72	66	79	88	96	100
	Phenylalanine	75	100	91	100	100	82	80	65	74	67
	Threonine	80	93	89	95	100	73	67	54	64	64
Tryptophan	66	100	79	90	90	74	70	55	63	56	
Tyrosine	83	100	86	89	88	90	92	81	91	93	
Valine	85	99	92	99	100	89	84	76	86	82	

D Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acids	Alanine	89	84	98	100	100	70	54	50	54	48
	Arginine	62	90	91	87	98	85	80	86	85	100
	Asparagine	79	78	90	100	97	64	44	32	37	33
	Aspartate	89	96	67	69	61	100	59	36	41	40
	Cysteine	63	91	77	94	100	56	60	56	64	57
	Glutamate	87	84	88	92	100	78	66	61	58	50
	Glutamine	66	59	78	86	100	64	54	55	64	70
	Glycine	73	89	84	99	100	74	63	43	43	34
	Proline	100	94	93	98	99	84	68	55	54	51
	Serine	64	57	74	76	100	62	45	58	62	75
	Methionine	86	76	86	94	100	13	17	14	15	17
	Histidine	77	78	77	87	100	83	75	64	73	75
	Isoleucine	82	68	68	58	71	100	88	78	85	82
	Leucine	86	69	72	65	84	100	91	79	93	91
	Lysine	55	69	70	69	77	70	72	79	84	100
	Phenylalanine	93	81	85	85	100	100	100	77	91	89
	Threonine	79	84	85	94	100	78	70	64	71	79
Tryptophan	95	82	84	81	99	100	100	72	86	82	
Tyrosine	82	67	64	64	70	96	100	81	100	93	
Valine	78	75	83	91	100	86	78	69	80	77	

Abb. 24. A-D Relative Mengen der proteinogenen Aminosäuren unter Methionin-Restriktion im Vergleich zwischen proliferativen (Serie I) und konfluenten (Serie II) Bedingungen in der Zelllinie L929. Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter Methionin-Restriktion sowohl unter proliferativen als auch konfluenten Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden 5×10^5 , 1×10^6 beziehungsweise 3×10^6 Zellen (siehe auch Material und Methoden) L929 in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Methionin-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst bei jeder Schale 1 ml Medium abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets jeweils geeicht auf 1×10^6 Zellen gebildet. Die Zellextrakte sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und abschließend zusammengefasst. In dieser Abbildung die gemittelten Ergebnisse der proteinogenen Aminosäuren gemessen in den Medienüberständen (extrazellulär) (A und B) sowie in den Zellextrakten (intrazellulär) (C und D) sowohl unter proliferativen als auch konfluenten Bedingungendargestellt.

Größtenteils lassen sich bei Betrachtung der proteinogenen Aminosäuren zwischen proliferativen und konfluenten Bedingungen keine markanten Unterschiede erkennen. Kleinere Unterschiede gibt es bei den Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Tryptophan. Diese Aminosäuren sind unter Methionin-freien Bedingungen im Vergleich zwischen proliferativ und konfluent, tendenziell bei konfluenten Bedingungen in erhöhter Konzentration vorhanden.

Die für die jeweiligen Aminosäuren unter Methionin-Restriktion nach 120h gemessenen Werte sind: Isoleucin: proliferativ 76 % und konfluent 82 %, Leucin: proliferativ 70 % und konfluent 91 % und Tryptophan: proliferativ 56 % und konfluent 82 %.

Neben dem Aminosäuregehalt, welcher durch die Methionin-Restriktion massiv beeinflusst wird, wurden auch die Metaboliten der bedeutenden Stoffwechselwege wie des Citratzyklus (TCA-Zyklus), des Harnstoffzyklus (Urea-Cycle), des Kohlenhydratstoffwechsel sowie die Pyrimidine und Purine analysiert.

Die folgende Abbildung (**Abb. 25**) zeigt eine detaillierte Übersicht einzelner Stoffwechselgruppen unter Methionin-Restriktion im Vergleich zwischen proliferativen (Serie I) und konfluenten (Serie II) Bedingungen. Dargestellt sind die summierten relativen Massen der Aminosäuren (ohne Methionin), des Citratzyklus (TCA-Zyklus), des Harnstoffzyklus (Urea-Cycle), der Kohlenhydrate, der Pyrimidine und Purine sowohl im Medienüberstand (Abb. 25A und C) als auch in den Zellextrakten (Abb. 25B und D).

Serie I: Proliferativ

A Media	24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acids	92	94	82	80	72	105	111	116	118	114
Urea Cycle	86	87	101	117	108	73	100	117	139	137
TCA Cycle	147	141	163	178	210	129	137	151	153	173
Carbohydrates	232	395	475	570	645	225	257	274	304	427
Pyrimidines	94	117	139	138	161	106	121	150	157	160
Purines	52	62	67	72	82	54	61	81	91	142

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

Serie II: Konfluent

C Media	24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acids	36	36	28	26	26	45	48	50	53	51
Urea Cycle	17	24	26	26	23	19	25	26	28	29
TCA Cycle	41	52	66	95	131	50	53	66	88	112
Carbohydrates	38	47	57	42	25	36	34	42	70	94
Pyrimidines	27	30	38	45	53	27	32	38	46	80
Purines	20	23	26	34	41	22	27	38	63	90

D Cells	24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Amino Acids	86	81	86	90	100	86	76	66	74	73
Urea Cycle	98	89	82	83	96	100	72	74	76	88
TCA Cycle	73	85	73	74	80	100	69	80	71	83
Carbohydrates	81	60	61	56	75	100	72	89	82	98
Pyrimidines	82	80	85	86	90	100	91	79	79	63
Purines	68	72	74	95	97	80	100	95	100	77

Abb. 25. A-D Übersicht einzelner Stoffwechselgruppen unter Methionin-Restriktion im Vergleich zwischen proliferativen (Serie I) und konfluenten (Serie II) Bedingungen in der Zelllinie L929. Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter Methionin-Restriktion unter proliferativen und konfluenten Bedingungen über fünf Tagen analysiert. Es wurden 5×10^5 , 1×10^6 bzw. 3×10^6 Zellen (siehe Material und Methoden) L929 in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Methionin-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde bei jeder Schale 1 ml Medium abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets (geeicht auf 1×10^6 Zellen) gebildet. Die Zellextrakte und der Überstand des Mediums wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und anschließend zusammengefasst. In dieser Abbildung ist eine Übersicht der gemessenen Metabolite der extrazellulären Medienüberstände (A und C) und der intrazellulären Zellextrakte (B und D) unter proliferativen (Serie I) und konfluenten (Serie II) Bedingungen im Vergleich dargestellt.

Auffällig ist die, sowohl unter proliferativen als auch konfluenten Bedingungen, unter Methionin-Restriktion kontinuierlich verringerte intrazelluläre Menge an Aminosäuren (proliferativ: von 83 % auf 65 % und konfluent: von 86 % auf 73 %) bei einer gleichzeitig erhöhten Sekretion von Aminosäuren ins Medium (und einem Anstieg von 105 % auf 114 % bei proliferativen Bedingungen und von 45 % auf 51 % bei konfluenten Bedingungen). Genau den entgegengesetzten Mechanismus erkennt man bei den Zellen unter Vollmedium. Hier stieg die intrazelluläre Konzentration (proliferativ: von 82 % auf 100 % und konfluent: von 86 % auf 100 %) an Aminosäuren, während sie extrazellulär mit der Zeit (proliferativ: von 92 % auf 72 % und konfluent: von 36 % auf 26 %) abnahm.

Trotz überwiegenden Gemeinsamkeiten und ähnlicher „Trends“ der beiden Systeme fallen im Vergleich zwischen konfluent und proliferativ kleinere Unterschiede bei den Kohlenhydraten und Purinen auf. Im Vergleich stagnierte die intrazellulär gemessene relative Menge der Kohlenhydrate (bei 100 % und 98 %) wie auch der Purine (bei 80 % und 77 %) unter konfluenten Bedingungen nahezu (Abb. 25D), während sie unter proliferativen Bedingungen sank (Kohlenhydrate von 79 % auf 65 % und Purine von 95 % auf 61 %) (Abb. 25B).

Im Allgemeinen stimmt der „Trend“ der beiden Systeme bzw. die Ergebnisse im Großteil überein, lediglich die Dynamik ist unter konfluenten Bedingungen nicht so ausgeprägt wie unter proliferativen.

Im Vorherigen wurde bereits auf die Vorteile des "Fast Tracking" in Form des Fußabdrucks als schnelle und einfache Methode zur Bestimmung des Low-Energy-Metabolismus eingegangen (Kapitel 3.2.4.1.1).

Serie I: Proliferativ

A Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Metabolite	ADP	100	41	29	22	10	49	0	1	4	3
	ATP	100	89	61	49	23	47	13	7	6	7
	Acetoacetate	65	77	66	65	61	61	81	85	100	97
	Creatine	52	68	68	100	96	66	66	52	53	40
	Spermidine	95	94	90	100	98	92	78	66	57	39
	GSSG	16	27	33	62	100	20	17	18	17	11
	UDP-Glc	53	77	35	17	12	58	84	69	100	92
	Pantothenate	63	84	79	100	94	48	37	36	41	37

0
10
20
35
50
60
70
80
90
100

Serie II: Konfluent

B Cells		24h Met(+)	48h Met(+)	72h Met(+)	96h Met(+)	120h Met(+)	24h Met(-)	48h Met(-)	72h Met(-)	96h Met(-)	120h Met(-)
Metabolite	ADP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	ATP	100	68	28	35	37	20	6	8	13	19
	Acetoacetate	44	31	30	27	36	74	67	59	91	100
	Creatine	58	72	83	96	100	68	65	54	52	41
	Spermidine	94	94	95	100	100	97	94	72	68	51
	GSSG	18	28	46	78	100	19	20	18	19	17
	UDP-Glc	36	11	14	9	13	100	70	52	76	71
	Pantothenate	84	87	80	100	98	64	49	53	60	69

0
10
20
35
50
60
70
80
90
100

Abb. 26. A und B Metabolischer Fußabdruck der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion im Vergleich zwischen proliferativen (Serie I) und konfluenten (Serie II) Bedingungen. Der Metabolismus der murinen Zelllinie L929 wurde unter Methionin-Restriktion sowohl unter proliferativen als auch konfluenten Bedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Es wurden 5×10^5 , 1×10^6 beziehungsweise 3×10^6 Zellen Zellen (siehe auch Material und Methoden) L929 in 15 cm Petrischalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit Methionin-freiem oder mit Vollmedium inkubiert. Für jeden Versuchstag erfolgte der Ansatz Vollmedium und Methionin-frei in Triplets. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde zunächst bei jeder Schale 1 ml Medium abgenommen, im Anschluss wurden Zellpellets jeweils geeicht auf 1×10^6 Zellen gebildet. Die Zellextrakte sowie der Überstand des Kultur-Mediums wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse und Auswertung der primären Daten erfolgten durch Herrn Dr. Werner Schmitz. Die Ergebnisse wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert und anschließend zusammengefasst. In dieser Abbildung sind einige ausgewählte Metabolite, die zum jetzigen Zeitpunkt für das Fast-Tracking des Low-Energy-Metabolismus besonders geeignet erscheinen, im Vergleich zwischen (A) proliferativen (Serie I) und (B) konfluenten (Serie II) Bedingungen dargestellt.

Metaboliten, die zum jetzigen Zeitpunkt besonders geeignet scheinen, um in den L929-Zellen das Vorliegen eines Low-Energy-Metabolismus zu bestimmen, sind Acetoacetat, Kreatin, Spermidin, GSSG, UDP-Glukose und die Pantothersäure sowie das Verhältnis von ADP/ATP. In der vorherigen Abbildung (Abb. 26) sind die genannten Metaboliten sowohl unter proliferativen wie auch konfluenten Bedingungen abgebildet.

Die gemessenen, intrazellulären Mengen der ausgewählten Metabolite ähneln sich unter proliferativen und konfluenten Bedingungen stark, zu vernachlässigen ist die nicht nachweisbare Menge an ADP unter konfluenten Bedingungen. Die ausgewählten Metabolite sind zur Differenzierung des Low-Energy-Metabolismus in der Zelllinie L929 geeignet, da der intrazelluläre Gehalt dieser Metabolite über einen Zeitraum von 5 Tagen in beiden Systemen spezifisch zu- oder abnimmt. Ganz deutlich ist z.B. der unter Methionin-Restriktion bei beiden Bedingungen im Vergleich zu den Normalbedingungen drastisch verringerte ATP Gehalt. Kreatin, Spermidin und UDP-Glukose nahmen im Verlauf unter Methionin-Restriktion ebenfalls deutlich ab, der GSSG- und Pantothersäuregehalt stagnierte unter Methionin-Restriktion, während das intrazelluläre Acetoacetat-Level anstieg.

Auffällig ist auch, dass die Konfluenz per se nicht zu einem dem Low-Energy-Metabolismus vergleichbaren Metabolismus führt. Obwohl die Zelle nicht mehr proliferiert, der Energiebedarf also sinkt, bleibt die Zelle unter normalen Bedingungen im High-Energy-Metabolismus. Dies wird vor allen Dingen am ATP-Gehalt erkennbar, welcher trotz Methionin-Restriktion hoch bleibt. Die Zellen bleiben also auf eine eventuelle Proliferation energetisch vorbereitet.

3.2.5 Aminosäure-Analoga als potentielle Caloric Restriction Mimetics

Die Methionin-Restriktion war im Labor gut umsetzbar und zeigte bei allen Zellen eine eindeutige Inhibition der Proliferation sowie bei der Zelllinie L929 ein metaboles Profil, das dem eines Low-Energy-Metabolismus entspricht. Die Umsetzung als Therapieoption gestaltet sich jedoch deutlich schwieriger, da man selbst durch eine strenge Diät die Methionin-Zufuhr über die Nahrung kaum verhindern kann.

Daher sollte im letzten Teil der Arbeit der Einfluss von verschiedenen Aminosäure-Analoga untersucht werden, die als potentielle Caloric Restriction Mimetics eingesetzt werden könnten. Auf molekularer Ebene sind viele verschiedene Wirkprinzipien der Analoga denkbar.

Vier Möglichkeiten, wie durch die Analoga im besten Fall einen Low-Energy-Metabolismus induziert werden könnte, sind im Folgenden kurz beschrieben:

(1) Das Analogon könnte durch die ähnliche beziehungsweise zum Teil gleiche Struktur statt Methionin am Anticodon der t-RNA binden und so über einen Kettenabbruch zur Inhibition der Proteinbiosynthese führen. Azidohomoalanin wird bereits in der Click-Chemie zur Markierung von Proteinen als Methionin-Analogon eingesetzt. Es wird statt Methionin bei der Proteinbiosynthese eingebaut und kann anschließend über eine reaktive Gruppe - z.B. ein Fluorophor - noch modifiziert werden (Ngo and Tirrell, 2011, Dieterich *et al.*, 2006).

(2) Durch die Strukturverwandtheit wäre auch eine Bindung des Analogons an der Aminoacylierungsstelle, dem aktiven Zentrum, der Aminoacyl-tRNA-Synthetase möglich, wodurch die tRNA-Synthese und in Folge ebenfalls die Proteinbiosynthese inhibiert werden würde.

(3) Alle methionin- und/oder cystein-abhängigen Syntheseprozesse, wie zum Beispiel die SAM-Synthese, könnten durch den Einsatz der Methionin-Analoga kompetitiv inhibiert werden. Der enge Zusammenhang und die große Bedeutsamkeit von SAM und Methionin für den durch die Methionin-Restriktion induzierten Low-Energy-Metabolismus wurde bereits erklärt (Kapitel 1.2.4 und Abb. 8).

(4) In Kapitel 1.2.4. wurde beschrieben, wie mTOR, über den G-Proteingekoppelten Rezeptor T1R und das Protein SAMTOR, die Menge an verfügbarem Methionin messen kann (Gu *et al.*, 2017). Auch diese beiden Sensoren, beziehungsweise die an der Messung des Methioningehalts beteiligten Faktoren, könnten durch die Methionin-Analoga beeinflusst werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Analoga lassen sich in folgende Gruppen einteilen (Abb. 27):

(A) Methionin-Analoga (von Methionin abgeleitet oder modifizierte Analoga):

D-Methionin, N-Formyl-L-Methionin, Boc-L-Methionin und F_{moc}-L-Methionin

(B) erweiterte Methionin-Analoga (mit nur annähernd ähnlicher Struktur):

D-Ethionin, L-Ethionin, L- γ -Azidohomoalanin und Z-DL- β -Homoalanin

(C) Cystein-Analoga:

D-Cystein

(D) Aminosäure-Analoga:

D-Lysin und L-Lysin.

In Abb. 27A sind D-Methionin, N-Formyl-L-Methionin, Boc-L-Methionin und F_{moc}-L-Methionin abgebildet, welche ausgehend von der Aminosäure Methionin abgeleitet beziehungsweise modifiziert wurden und daher starke strukturelle Ähnlichkeiten haben. Alle Aminosäuren (abgesehen von Glycin) tragen am α -C-Atom vier verschiedene Substituenten, je nach räumlicher Konfiguration unterscheidet man zwischen D- und L-Stereoisomeren. Proteinogene Aminosäuren sind in der Regel L-Aminosäuren. Schon 1976 konnten Naylor und Kollegen aufzeigen, dass einige Tumorzellen im Gegensatz zu normalen Körperzellen D-Aminosäuren aufgrund eines Mangels des Enzyms D-Aminosäureoxidase nicht verstoffwechseln können (Naylor *et al.*, 1976). In einer anderen Studie konnte bereits der inhibitorische Einfluss von D-Aminosäuren auf das Tumorstadium gezeigt werden (Sasamura *et al.*, 1998). Daher wurde unter anderem der Einfluss nicht-proteinogener D- α -Aminosäuren, wie D-Methionin, D-Ethionin, D-Cystein und D-Lysin, untersucht. Des Weiteren kam N-Formyl-L-Methionin zum Einsatz, welches ein entscheidendes Molekül beim Start der bakteriellen Proteinbiosynthese ist. Boc-L-Methionin und F_{moc}-L-Methionin wurden ebenfalls in dieser Arbeit untersucht – diese beiden Moleküle werden in der Festphasensynthese oder auch Merrifield-Synthese, einem Verfahren zur Peptid-Synthese, eingesetzt (Merrifield, 1963). Es handelt sich hierbei um die durch die Schutzgruppe Boc

oder F_{moc} , geschützte Aminosäure L-Methionin. Boc steht für tert-Butyloxycarbonyl und F_{moc} steht für Fluorenylmethoxycarbonyl. Durch Boc und F_{moc} wird die Aminogruppe der Aminosäure Methionin geschützt, wodurch es zum Kettenabbruch bei der Proteinsynthese kommt, da die Ausbildung einer Peptidbindung durch die Schutzgruppe verhindert wird.

Abb. 27B zeigt die Strukturformeln der Analoga D-Ethionin, L-Ethionin, L- γ -Azidohomoalanin und Z-DL- β -Homoalanin. (Azido-)homoalanin wurde analysiert, da es wie bereits erwähnt nachgewiesenermaßen statt Methionin bei der Proteinbiosynthese eingebaut werden kann. Die in der Abbildung (**Abb. 27B**) erwähnte Abkürzung Cbz steht, ebenfalls wie F_{moc} und Boc, für eine Schutzgruppe, in diesem Fall Benzyloxycarbonyl. Über Ethionin gibt es bereits Studien, die einen positiven Einfluss auf Tumorerkrankungen beschreiben (Guo *et al.*, 1996).

Abb. 27C zeigt die Strukturformeln von D-Cystein. Aufgrund des engen Zusammenhangs des Methionin-Cystein-Stoffwechsels wurde in dieser Arbeit neben der Methionin-Restriktion auch die Cystein- beziehungsweise die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion untersucht. Da beides wirksame Methoden zur Inhibition des Zellwachstums zu sein scheinen, wäre auch der Einsatz eines Cystein-Analogons, zum Beispiel in Form von D-Cystein anstatt eines Methionin-Analogons als potentiell CRM denkbar.

Die zwei getesteten Aminosäuren D-Lysin und L-Lysin sind in Abb. 27D abgebildet. D-Lysin stellt ebenfalls eine zentrale Aminosäure im Stoffwechsel dar. Dies konnte schon an eigenen Ergebnissen in der Massenspektrometrie gezeigt werden. Lysin war eine der Aminosäuren, deren Konzentration unter Methionin-Restriktion intrazellulär anstieg (Abb. 18). Ebenfalls ist die große Bedeutung von Lysin im Tumorstoffwechsel bekannt (Gil *et al.*, 2017).

Ein Low-Energy-Metabolismus geht in der Regel mit einer Senkung der Zellzahl einher, da z.B. mittels mTOR die Proliferation inhibiert wird. Daher wurde der Einfluss der Analoga als potentielle CRMS zunächst in einfachen Zytotoxizitätsassays zur Quantifizierung der relativen Zellzahl untersucht.

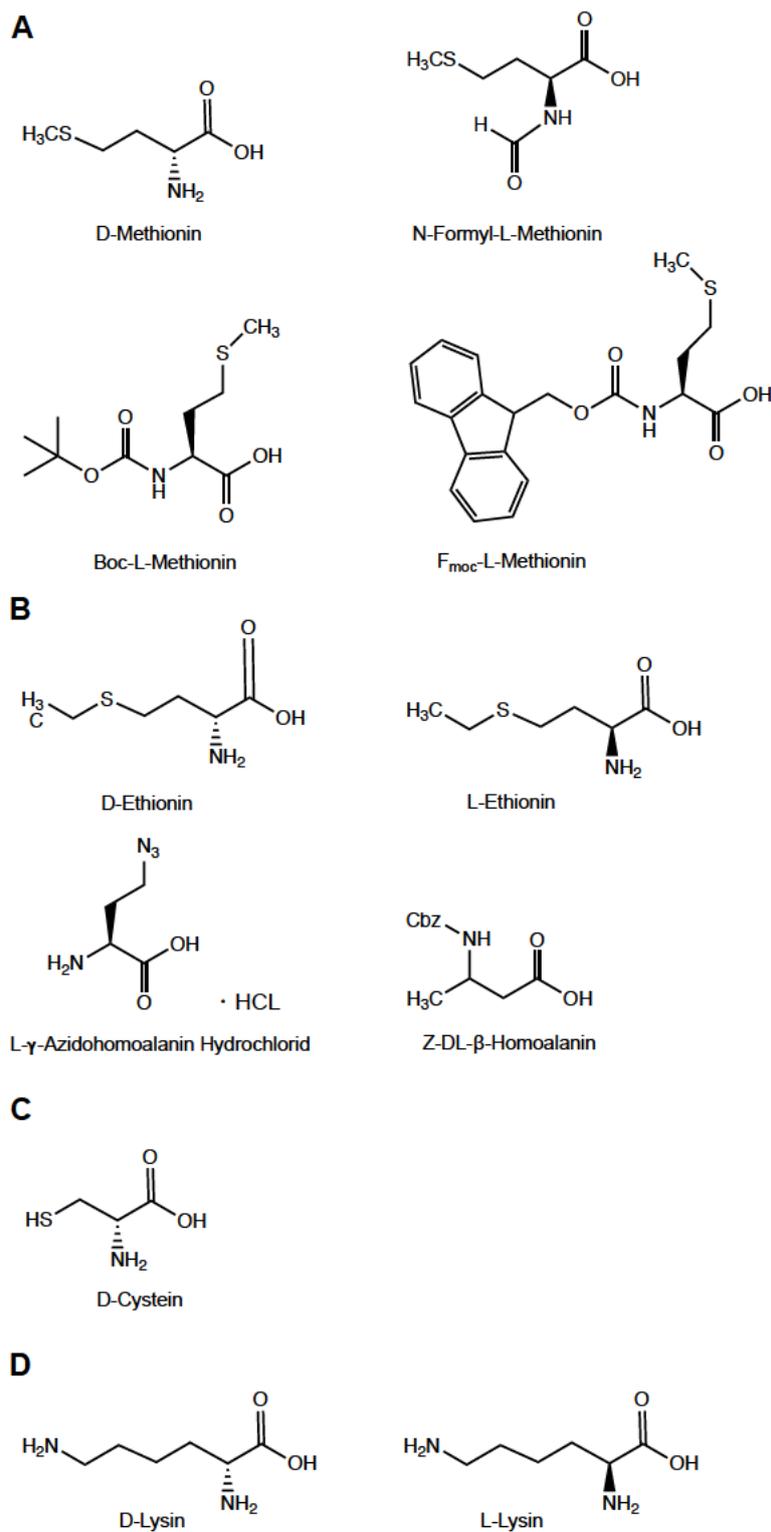


Abb. 27. A-D Strukturformeln der Aminosäure-Analoga. Die Abbildung zeigt die Strukturformeln der verwendeten Analoga, welche in folgenden Gruppen eingeteilt wurden: **A)** Methionin-Analoga, **B)** erweiterte Methionin-Analoga, **C)** Cystein-Analoga und **D)** Aminosäure-Analoga (erstellt mit ChemDraw®, für Mac Version 19.0.1.32).

3.2.5.1 ZytoTox mit Aminosäure-Analoga unter proliferativen Bedingungen in L929

Das Potential der einzelnen Moleküle als CRM sollte zunächst an der murinen Zelllinie L929 getestet werden. Grund hierfür ist wie bereits erwähnt der wesentlich höhere und schnellere Metabolismus sowie die hohe und zügige Responsivität dieser Zelllinien auf eine Methionin-Restriktion. Die Zellen wurden hierfür unter proliferativen Bedingungen mit den jeweils einzeln im Medium gelösten Analoga inkubiert. 72 h später erfolgte die Zellquantifizierung anhand einer Kristallviolett-Lebendfärbung. Tab. 16 gibt die Konzentration und Menge der verwendeten Analoga an.

Analoga	gelöst in	Konzentration [mM]	Zugabe zum Medium [%]	finale Konzentration im Medium [mM]
D-Cystein	1N HCl	496	1,25	6,20
D-Lysin	aqua dest.	205	5,00	10,25
L-Lysin	aqua dest.	205	5,00	10,25
D-Methionin	aqua dest.	201	5,00	10,05
Boc-L-Methionin	Ethanol absolut	241	2,50	6,03
D-Ethionin	1N HCl	735	1,25	9,19
L-Ethionin	1N HCl	735	1,25	9,19
N-Formyl-L-Methionin	Methanol	169	5,00	8,45
Z-DL- β -Homoalanin	DMSO	253	1,25	3,16
L- γ -Azidohomoalanin Hydrochlorid	DMSO	333	1,25	4,16
Fmoc-L-Methionin	DMSO	162	1,25	2,03

Tab. 16. Übersicht der Konzentration und Menge der verwendeten Analoga.

Die Ergebnisse der photometrischen Auswertung sind in der folgenden Abbildung (Abb. 28) dargestellt. Wirksame Moleküle wurden dann in einem weiteren Schritt in den humanen Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9, SCC25, HeLa und HaCaT untersucht.

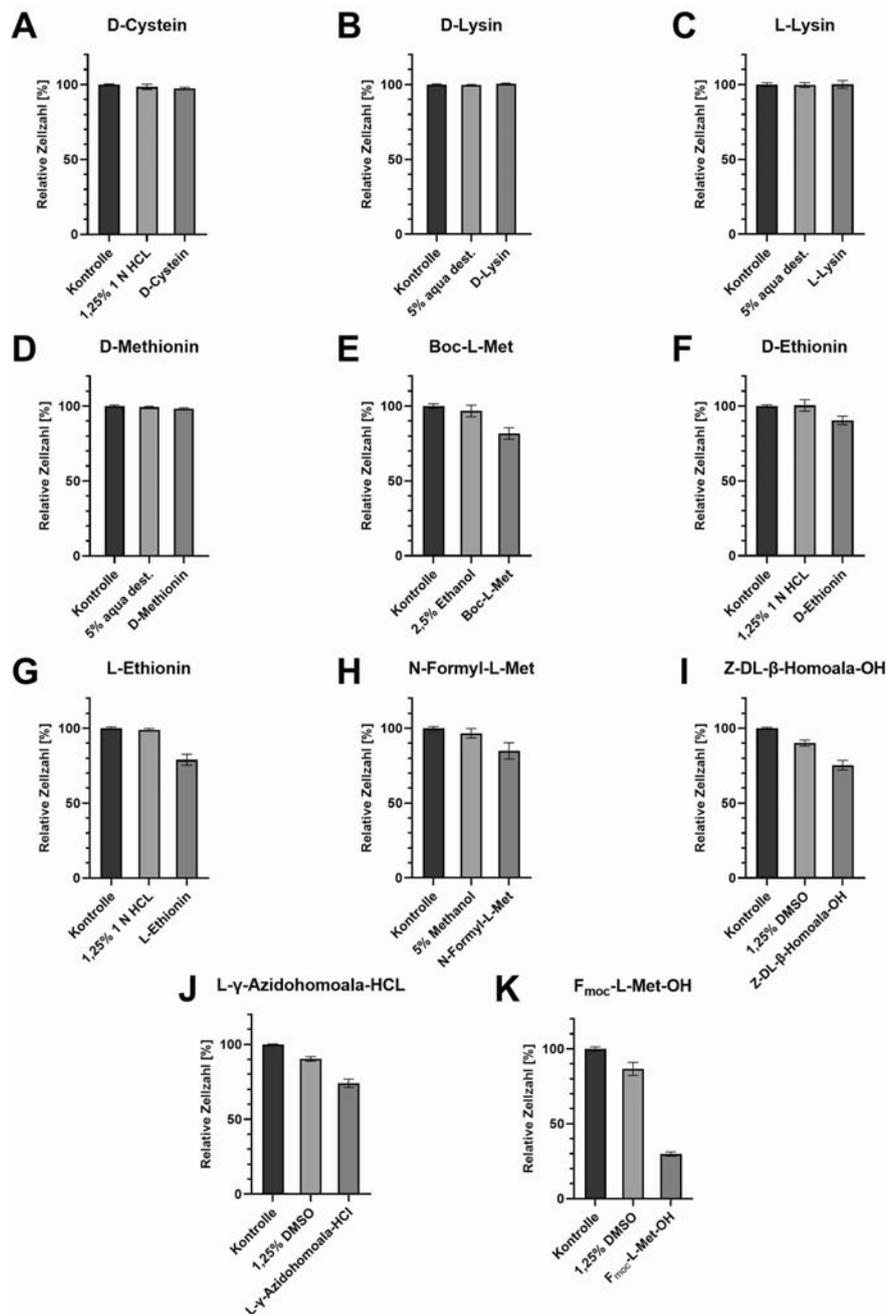


Abb. 28. A-K ZytoTox nach Zugabe von Aminosäure-Analoga zu der murinen Zelllinie L929 unter proliferativen Bedingungen. Die relative Zellzahl der murinen Zelllinie L929 wurde 72 h nach Zugabe von Aminosäure-Analoga analysiert. Dazu wurden 10.000 Zellen/Well in Fünffachansätzen in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit den gelösten Aminosäure-Analoga und der entsprechenden Kontrolle mit den Lösungsmitteln der Analoga in gleicher Endkonzentration (HCL, aqua dest., Ethanol, Methanol oder DMSO) inkubiert. Die jeweiligen Konzentrationen sind: D-Cystein 6,2 mM, D-Lysin 10,25 mM, L-Lysin 10,25 mM, D-Methionin 10,25 mM, Boc-L-Methionin 6,03 mM, D-Ethionin 9,19 mM, L-Ethionin 9,19 mM, N-Formyl-L-Methionin 8,45 mM, Z-DL-β-Homoalanin 3,16 mM, L-γ-Azidohomoalanin Hydrochlorid 4,16 mM und Fmoc-L-Methionin 2,03 mM. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der zwei Versuche sind in den Abbildungen zusammengefasst.

Die Zugabe der Analoga beeinflusste die relative Zellzahl in unterschiedlichem Ausmaß. D-Cystein, D-Lysin, L-Lysin und D-Methionin hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum der murinen Fibroblastenzelllinie (Abb. 28A-D). Boc-L-Methionin, D-Ethionin, L-Ethionin, N-Formyl-L-Methionin, Z-DL- β -Homoalanin sowie L- γ -Azidohomoalanin führten zu einer signifikanten Abnahme der relativen Zellzahl (Abb. 28E-J). F_{moc}-L-Methionin hatte den stärksten Effekt (Abb. 28K) und führte innerhalb von 72 h zu einer relativen Zellzahl von 29,7 % \pm 1,4 %.

Da die murinen Zelllinie L929 am deutlichsten auf die Zugabe von F_{moc}-L-Methionin reagierte, wurde dessen Wirkspektrum anhand einer Verdünnungsreihe analysiert. Die folgende Abbildung (Abb. 29) zeigt die relativen Zellzahlen der murinen Zelllinie L929 72 h nach Zugabe von F_{moc}-L-Methionin zum Medium in einer log₂-Verdünnungsreihe (höchste Konzentration: 2000 nM F_{moc}-L-Methionin).

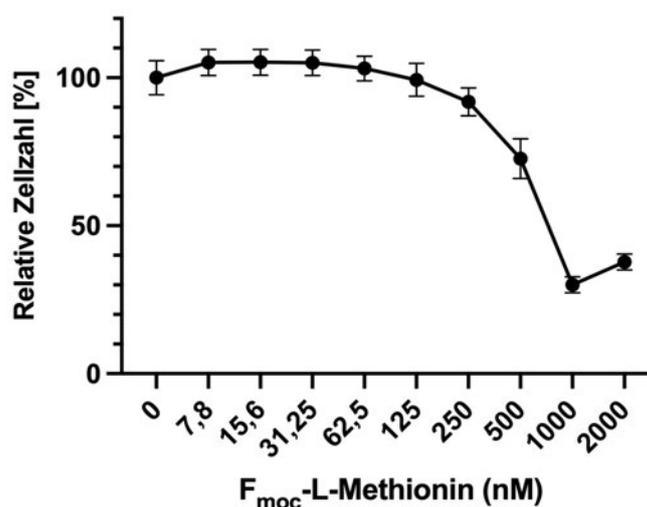


Abb. 29. ZytoTox-Analyse der Inhibition der Proliferation durch F_{moc}-L-Methionin in L929. Die Zellzahl der murinen Zelllinie wurde 72 h nach Zugabe von F_{moc}-L-Methionin analysiert. Es wurden 10.000 Zellen/Well in Sechsfachansätzen in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit F_{moc}-L-Methionin in einer log₂-Verdünnungsreihe und zur Kontrolle mit Medium (1,25 % DMSO) inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der drei Versuche sind in der Abbildung zusammengefasst.

Den stärksten inhibierenden Effekt hatte die Zugabe von 1000 nM F_{moc}-L-Methionin, diese Konzentration führte zu einer Senkung der relativen Zellzahl auf 30,0 % \pm 2,7 %.

Auch die Zugabe von Boc-L-Methionin, D-Ethionin, L-Ethionin und N-Formyl-L-Methionin verringerte die relative Zellzahl. Da der Einfluss dieser Moleküle nicht so deutlich war, wurden diese Analoga in dieser Arbeit nicht weiteruntersucht, ob sie aber zum Beispiel eine Veränderung auf Ebene des Metabolismus der murinen Zelllinie L929 bewirken, bleibt Bestandteil weiterer Untersuchungen. Z-DL- β -Homoalanin war mit einer Reduktion der relativen Zellzahl auf $75,3 \% \pm 3,2 \%$ (Abb. 28I) nahezu gleich wirksam wie das stereochemisch eng verwandte L- γ -Azidohomoalanin auf $74,0 \% \pm 2,8 \%$ (Abb. 28K). In dieser Arbeit wurde dennoch zunächst nur die Reinform L- γ -Azidohomoalanin weiter untersucht, da sich diese eventuell durch eine spezifischere Wirkung und signifikantere Ergebnisse auszeichnen könnte.

3.2.5.2 L- γ -Azidohomoalanin und F_{moc}-L-Methionin als Aminosäure-Analoga in L929, HeLa, HaCaT und Zelllinien des HNSCC

Die Zugabe von L- γ -Azidohomoalanin bewirkte bei der Zelllinie L929 innerhalb von 72 h eine Reduktion der relativen Zellzahl auf $74,0 \% \pm 2,8 \%$ (Abb. 28J). F_{moc}-L-Methionin bewirkte bei dieser Zelllinie eine Reduktion der relativen Zellzahl auf $33,8 \% \pm 1,7 \%$ (Abb. 28K). Der Einfluss dieser Analoga auf die humanen Zelllinien sollte daher in weiteren Zytotoxizitätsassays analysiert werden. Die Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9, SCC25, HeLa und HaCaT wurden genauso wie die im vorherigen Kapitel bereits beschriebene Zelllinie L929 unter proliferativen Bedingungen mit den im Medium gelösten Analoga inkubiert. 72 h später erfolgte die Zellquantifizierung anhand einer Kristallviolett-Lebendfärbung. Bezüglich der Konzentration und Menge der verwendeten Analoga gelten die Angaben in Tab. 16.

Die Wirkung von L- γ -Azidohomoalanin auf die vier humanen HNSCC-Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 sowie auf die humanen Referenzzelllinien HeLa und HaCaT unter proliferativen Bedingungen ist in der folgenden Abbildung (Abb. 30) zu sehen.

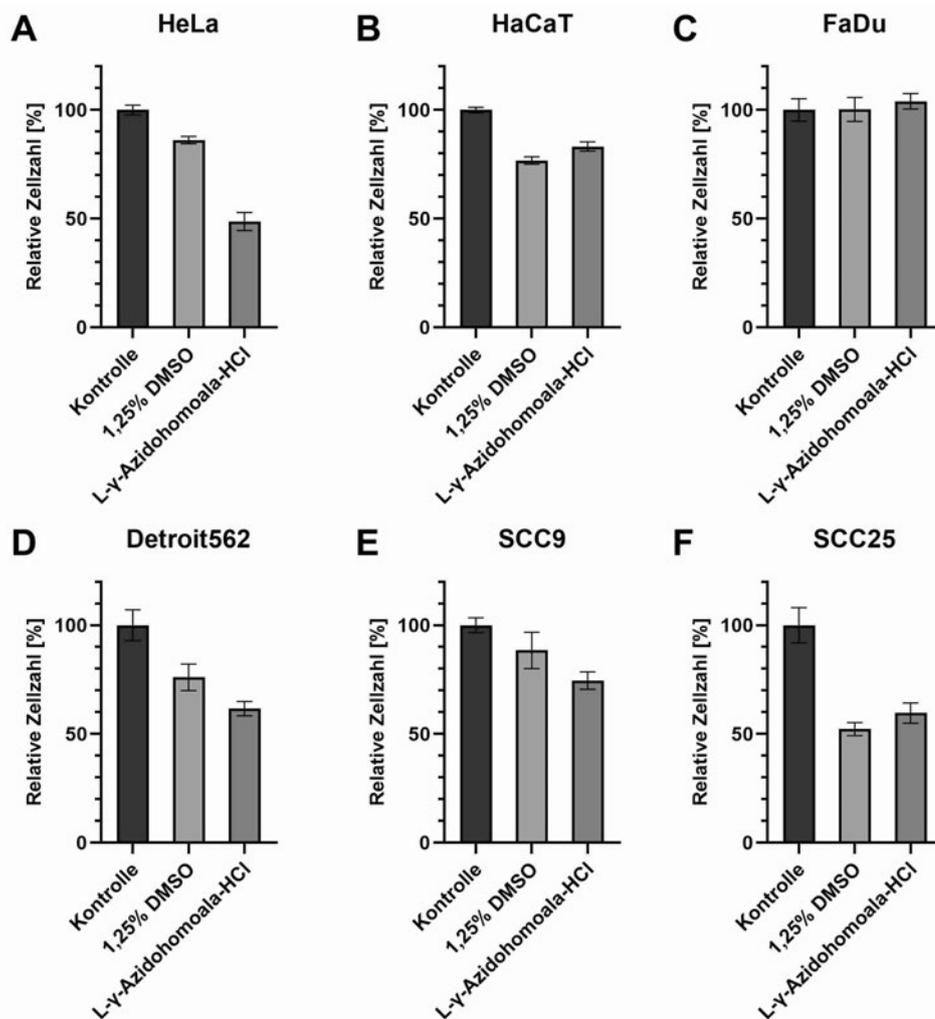


Abb. 30. A-F ZytoTox 72 h nach Zugabe von L-γ-Azidohomoalanin zu den Zelllinien HeLa, HaCaT, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 unter proliferativen Bedingungen. Die relative Zellzahl der genannten Zelllinien wurde 72 h nach Zugabe von L-γ-Azidohomoalanin analysiert. Es wurden jeweils 10.000 Zellen/Well in Fünffachansätzen in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit im Medium gelösten L-γ-Azidohomoalanin (4,16mM) und zur Kontrolle mit einer Mediumvariante die entsprechend zum Analogon 1,25 % DMSO enthält sowie dem Vollmedium inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der zwei Versuche sind in den Abbildungen zusammengefasst.

Wie bei der bereits analysierten Zelllinie L929 bewirkte L-γ-Azidohomoalanin auch bei den Zelllinien HeLa, Detroit562 und SCC9 eine signifikante Verminderung der Zellzahl. Bei HeLa war der Effekt am deutlichsten und führte zu einer relativen Zellzahl von $48,7 \% \pm 4,1 \%$ (Abb. 30A), bei Detroit562 zu $61,7 \% \pm 3,3 \%$ (Abb. 30D) und bei SCC9 zu $74,5 \% \pm 4,0 \%$ (Abb. 30E). Die relative Zellzahl der Zelllinien HaCaT, FaDu und SCC25 wurde durch die Zugabe des Analogons nahezu nicht beeinträchtigt (Abb. 30B, C und F).

Die folgende Abbildung (Abb. 31) zeigt die Wirkung von F_{moc} -L-Methionin auf die vier humanen HNSCC-Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 sowie auf die humanen Referenzzelllinien HeLa und HaCaT unter proliferativen Bedingungen.

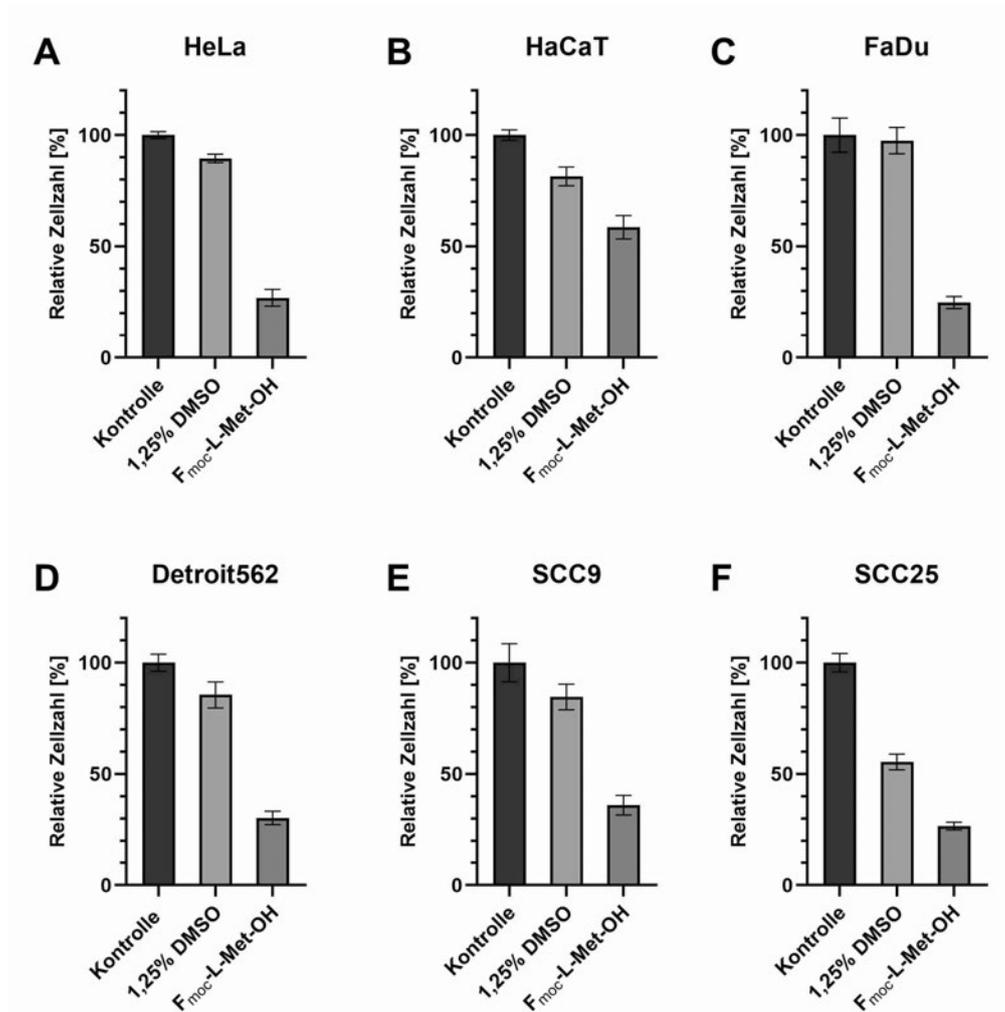


Abb. 31. A-F ZytoTox 72 h nach Zugabe von F_{moc} -L-Methionin zu den Zelllinien HeLa, HaCaT, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 unter proliferativen Bedingungen. Die relative Zellzahl der genannten Zelllinien wurde 72 h nach Zugabe von F_{moc} -L-Methionin analysiert. Es wurden jeweils 10.000 Zellen/Well in Fünffachansätzen in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit im Medium gelösten F_{moc} -L-Methionin (2,03mM) und zur Kontrolle mit einer Mediumvariante die entsprechend zum Analogon 1,25 % DMSO in Endkonzentration enthält sowie dem Vollmedium inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der drei Versuche sind in den Abbildungen zusammengefasst.

Wie auch bei der murinen Zelllinie L929 bewirkte F_{moc} -L-Methionin bei den untersuchten Zelllinien eine deutliche Zellzahlreduktion. Bei allen untersuchten Zelllinien, außer HaCaT, wurde die relative Zellzahl so um deutlich mehr als 50 %

reduziert. Die gemessenen Werte sind für HeLa $26,8 \% \pm 3,8 \%$ (Abb. 31A), für HaCaT $58,6 \% \pm 5,2 \%$ (Abb. 31B), für FaDu $24,7 \% \pm 2,7 \%$ (Abb. 31C), für Detroit562 $30,2 \% \pm 3,0 \%$ (Abb. 31D), für SCC9 $35,9 \% \pm 4,4 \%$ (Abb. 31E) und für SCC25 $25,6 \% \pm 1,8 \%$ (Abb. 31F).

Anhand dieses Versuchs konnte gezeigt werden, dass die Zugabe beider Moleküle, L- γ -Azidohomoalanin und F_{moc}-L-Methionin, in den untersuchten Zelllinien die relative Zellzahl beeinflusst. L- γ -Azidohomoalanin führte bei vier der sieben analysierten Zelllinien unter proliferativen Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl und F_{moc}-L-Methionin bei allen untersuchten Zelllinien.

Unter den gewählten Bedingungen ist jedoch nicht auszuschließen, dass der zellzahlvermindernde Effekt auf eine rein zytotoxische Wirkung von L- γ -Azidohomoalanin und F_{moc}-L-Methionin (beziehungsweise bei deren Verstoffwechslung entstehende Metabolite) zurückzuführen ist. Daher wurden beide Moleküle in einem weiteren Assay auf ihre potentielle Toxizität untersucht.

Wie bereits im Kapitel 3.1.3.2 für die Methionin-Restriktion beschrieben wurden ebenfalls Zytotoxizitätsassays unter konfluenten Bedingungen durchgeführt. Die untersuchten Zelllinien FaDu, Detroit562, HeLa, HaCaT, SCC9, SCC25 und L929 wurden hierfür unter konfluenten Bedingungen mit den im Medium gelösten Analoga inkubiert. 72 h später erfolgte die Zellquantifizierung anhand einer Kristallviolett-Lebendfärbung. Auch hier gelten bezüglich der Konzentration und Menge der verwendeten Analoga die Angaben in Tab. 16.

Die Wirkung von L- γ -Azidohomoalanin auf die vier humanen HNSCC-Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 sowie auf die humanen Referenzzelllinien HeLa und HaCaT unter konfluenten Bedingungen ist in der folgenden Abbildung (Abb. 32) dargestellt.

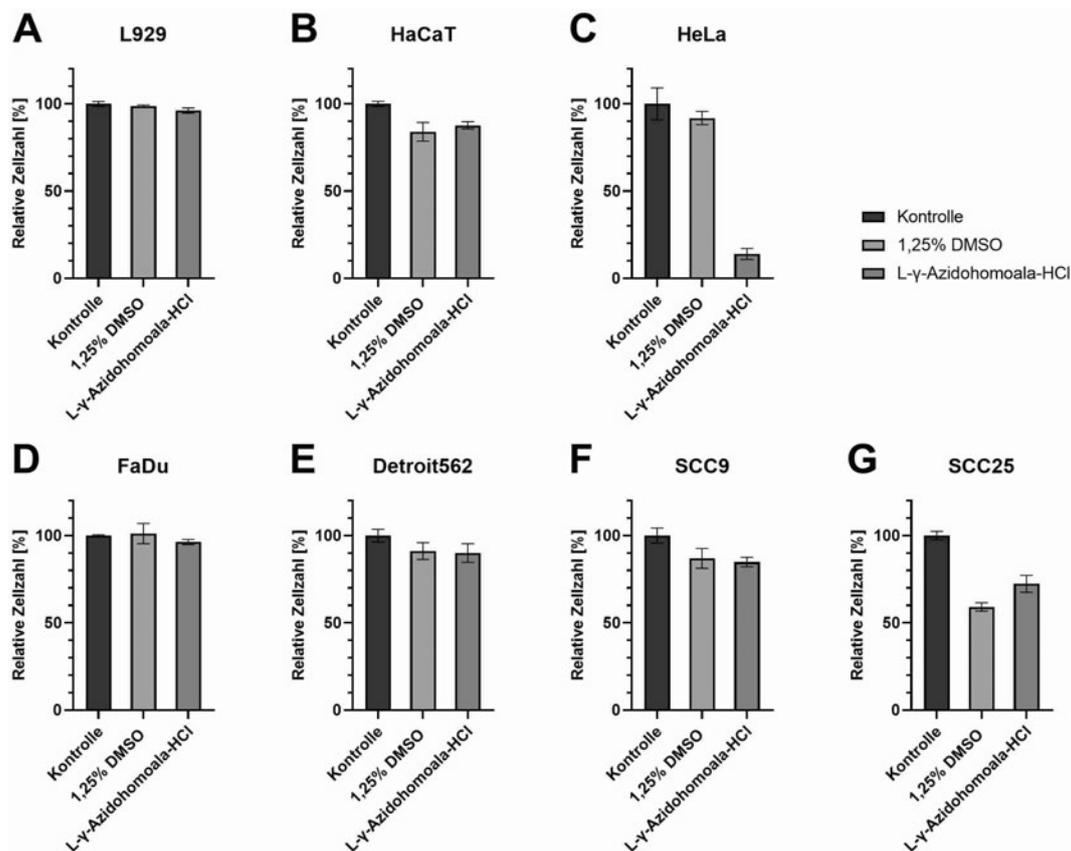


Abb. 32. A-G ZytoTox 72 h nach Zugabe von L-γ-Azidohomoalanin zu den Zelllinien L929, HaCaT, HeLa, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 unter konfluenten Bedingungen. Die relative Zellzahl der genannten Zelllinien wurde 72 h nach Zugabe von L-γ-Azidohomoalanin analysiert. Es wurden jeweils 10.000 Zellen/Well in Fünffachansätzen in einer 96-Well-Platte ausgesät. 96 h später wurden die Zellen mit im Medium gelösten L-γ-Azidohomoalanin (4,16mM) und zur Kontrolle mit einer Mediumvariante die 1,25 % DMSO enthält sowie dem Vollmedium inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der zwei Versuche sind in den Abbildungen zusammengefasst.

Unter konfluenten Bedingungen führte die Zugabe von L-γ-Azidohomoalanin nur bei der Zelllinie HeLa zu einer Abnahme der relativen Zellzahl. Bei dieser Zelllinie bewirkte das Analogon jedoch eine sehr deutliche Reduktion der Zellzahl auf $14,0 \% \pm 3,1 \%$ (Abb. 32C). Anhand dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass L-γ-Azidohomoalanin per se nicht zytotoxisch ist, in diesem Fall würde man eine Reduktion bei den meisten oder allen untersuchten Zelllinien erwarten.

Die Wirkung von F_{moc} -L-Methionin auf die vier humanen HNSCC-Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 sowie auf die humanen Referenzzelllinien HeLa und HaCaT unter konfluenten Bedingungen ist in der folgenden Abbildung (Abb. 33) dargestellt.

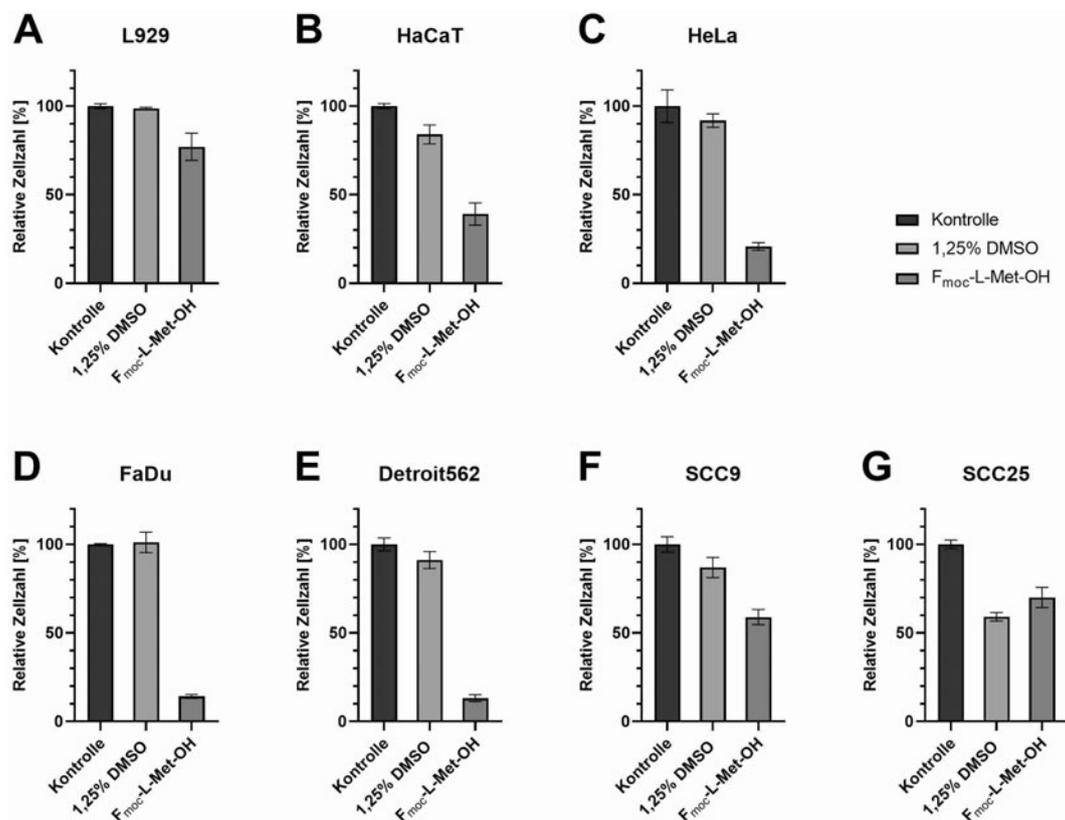


Abb. 33. A-G ZytoTox 72 h nach Zugabe von F_{moc} -L-Methionin zu den Zelllinien L929, HaCaT, HeLa, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 unter konfluenten Bedingungen. Die relative Zellzahl der genannten Zelllinien wurde 72 h nach Zugabe von F_{moc} -L-Methionin analysiert. Es wurden jeweils 10.000 Zellen/Well in Fünffachansätzen in einer 96-Well-Platte ausgesät. 96 h später wurden die Zellen mit im Medium gelösten F_{moc} -L-Methionin (2,03mM) und zur Kontrolle mit einer Mediumvariante die 1,25 % DMSO enthält sowie dem Vollmedium inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. Die gemittelten Ergebnisse der drei Versuche sind in den Abbildungen zusammengefasst.

Unter konfluenten Bedingungen führte die Zugabe von F_{moc} -L-Methionin bei allen untersuchten Zelllinien zu einer Abnahme der relativen Zellzahl. Der drastischste Effekt konnte bei den Zelllinien HeLa, FaDu und Detroit562 festgestellt werden, aber auch bei den Zelllinien L929, HaCaT und SCC9 war eine deutliche Reduktion zu erkennen. F_{moc} -L-Methionin bewirkte bei der Zelllinie SCC25 im Vergleich zur Kontrolle (1,25 % DMSO) keine Zellzahlreduktion und scheint daher für diese Zelllinie nicht zytotoxisch zu sein.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Aminosäure-Restriktion in Form der Methionin- und Cystein-Restriktion auf die Proliferation von humanen Plattenepithelzelllinien (FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25) sowie den als Kontrolle verwendeten humanen Zelllinien HeLa und HaCaT und der murinen Fibroblastenzelllinie L929 untersucht. *In vitro* sollte u.a. analysiert werden, ob sich dieser Ansatz grundsätzlich als Therapieform im Plattenepithelkarzinom eignet (Abb. 34, links).

Die Zelllinie L929 diene zudem zur Etablierung eines murinen Zellsystems, das zukünftig die einfache und schnelle Analyse von z.B. CRMs ermöglichen soll. Der Metabolismus dieser Zellen wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen alle 24 h anhand massenspektrometrischer Untersuchungen analysiert. Diese Ergebnisse dienten der Erstellung eines metabolen Fingerabdrucks, der charakteristisch für die Methionin-Restriktion beziehungsweise den somit induzierten Low-Energy-Metabolismus ist. Dabei sollten die Zellen sowohl unter proliferierenden wie nicht proliferierenden Bedingungen analysiert werden, um die beiden Situationen des Tumors – metastasierend beziehungsweise stagnierend/etabliert – auf der Ebene des Metabolismus zu simulieren (Abb. 34, Mitte).

Zusätzlich wurde der Einfluss der Methionin-Restriktion auf die Gesamtproteinmenge bzw. die Proteinexpression in L929 mittels eines modifizierten Bradfords analysiert (Abb. 34, Mitte).

Da die Methionin-Restriktion im Labor *in vitro* zwar gut durchführbar ist, aber die Umsetzung als Therapieoption deutlich schwieriger ist, wurden verschiedene Aminosäure-Analoga untersucht, die künftig als potentielle CRMs eingesetzt werden könnten (Abb. 34, rechts).

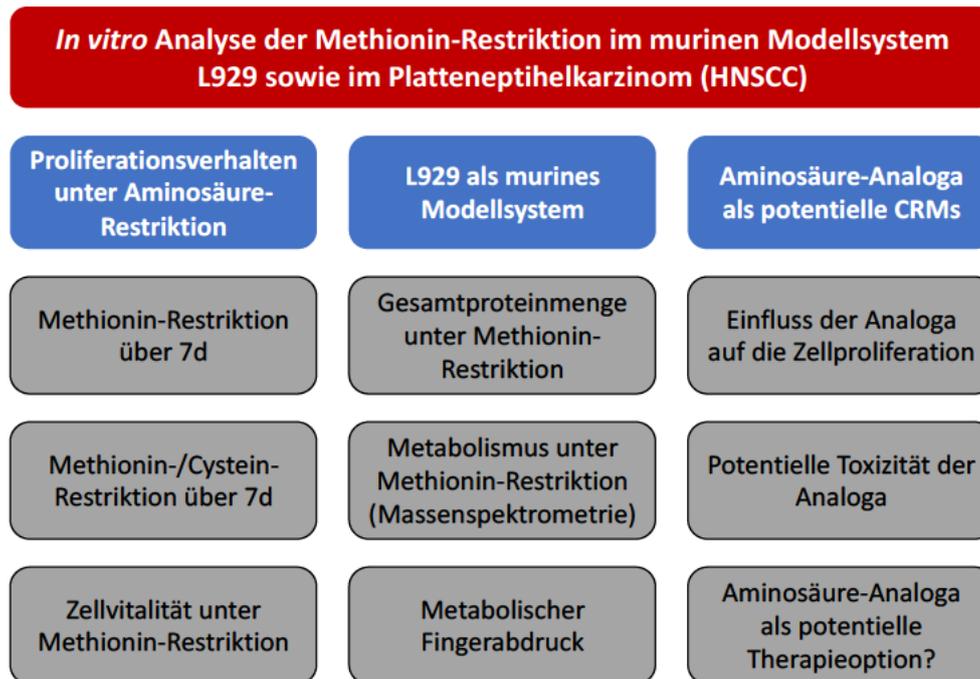


Abb. 34. Arbeitsprogramm – schematische Übersicht.

Die grundlegenden Ergebnisse, die anhand dieser Arbeit gewonnen werden konnten, werden schwerpunktmäßig diskutiert und umfassen die folgenden Themenbereiche:

- (1) Die Aminosäure-Restriktion (sowohl die Methionin-, die Cystein- als auch die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion) hat eine antiproliferative Wirkung auf die untersuchten Zelllinien.
- (2) Die Methionin-Restriktion scheint die zelluläre Gesamtproteinmenge in der murinen Zelllinie L929 nicht drastisch zu beeinflussen.
- (3) Die Methionin-Restriktion wird auf Ebene des Metabolismus der murinen Zelllinie L929 stark reflektiert und eignet sich daher zur Erhebung des metabolischen Fuß-/Fingerabdrucks des Low-Energy-Metabolismus unter Methionin-Restriktion. Diese ähneln sich unter proliferativen und konfluenten Bedingungen stark. Auffällig ist, dass die Konfluenz per se nicht zu einem dem Low-Energy-Metabolismus vergleichbaren Metabolismus führt. Obwohl die Zelle nicht mehr proliferiert, der Energiebedarf also sinkt, bleibt die Zelle unter normalen Bedingungen im High-Energy-Metabolismus.

- (4) Die Zelllinien reagieren auf verschiedene Aminosäure-/Methionin-Analoga. Der Einsatz von Aminosäure-Analoga als CRM scheint grundsätzlich eine mögliche Option darzustellen. Jedoch muss in weiterführenden Untersuchungen unter anderem der exakte Wirkmechanismus der Analoga, wie auch die potentiell zytotoxische Wirkung genauer analysiert werden.

4.1 Antiproliferative Wirkung der Methionin-Restriktion in HNSCC-Zelllinien

Die Aminosäure-Restriktion (sowohl die Methionin-, die Cystein- als auch die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion) führte bei allen analysierten Zelllinien zu einer signifikanten Zellzahlreduktion. Jedoch stellt sich die grundlegende Frage, ob das Prinzip des durch die Methionin-Restriktion induzierten Low-Energy-Metabolismus und die damit einhergehende verminderte Zellproliferation wirklich funktioniert, oder ob die Zellzahlregression lediglich auf einem vermehrten Zelltod beruht.

Aus diesem Grund wurden die Zellen zunächst über einen Zeitraum von fünf Tagen unter Methionin-Restriktion mikroskopisch analysiert (Abb. 10). Anhand der mikroskopischen Aufnahmen waren keine morphologisch relevanten Unterschiede zwischen den Zellen unter Methionin-Restriktion gegenüber den Zellen in Vollmedium zu erkennen. Zu den Untersuchungszeiträumen machten alle analysierten Zelllinien einen vitalen Eindruck und es gab keine Anzeichen, die auf einen schlechten physiologischen Zustand oder gar eine Form des Zelltodes hindeuteten.

Neben der mikroskopischen Analyse wurde in ZytoTox-Assays unter konfluenten Bedingungen analysiert, ob die Methionin-Restriktion die Zellproliferation inhibiert, oder ob der Zelltod in irgendeiner Form Einfluss auf die Zellzahl hatte. Das Ergebnis war, dass die Zellzahl unter Methionin-freien Bedingungen um maximal 10 % geringer war. Dies ist entweder auf eine verlangsamte Proliferation im Vergleich zur Kontrolle zurückzuführen, da die Zellen auch unter fast konfluenten Bedingungen immer noch etwas proliferieren können, oder aber auf

einen Zelltod mit einem Wert von höchstens ca. 10 % (Abb. 11). Im letzteren Fall spielt der Zelltod aber nur für einen sehr geringen Teil der Zellen eine Rolle und der grundlegende Effekt der Zellreduktion kann auf eine verminderte Zellproliferation zurückgeführt werden.

Zudem wurden die Zellen mittels WST1-Vitalitäts-Assays nach 24 h und 120 h unter Methionin-Restriktion untersucht. Diese Methode beruht auf der Messung der Stoffwechselaktivität in Form von Reduktionsäquivalenten. Das Schlüssel-molekül für die mitochondriale Reduktion, auf der Vitalitätsassays wie der MTT- oder der in dieser Arbeit genutzte WST1-Assay beruhen, ist NAD(P)H. Allerdings wird die NAD(P)H-Konzentration wie auch die metabolische Aktivität durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, was zu einer möglichen Fehleinschätzung der Ergebnisse führt. Daher stellen die erwähnten Assays keine geeignete Methode zur exakten Quantifizierung von Zellen dar (Stepanenko and Dmitrenko, 2015). Da aber nur vitale Zellen WST1 reduzieren können, diente dieser Versuch hier als weiterer Vitalitätsnachweis der Zellen unter Methionin-Restriktion. Das verringerte Signal der Zellen unter Methionin-Restriktion kann entweder eine geringere Zellzahl, eine verringerte Stoffwechselaktivität oder eine Kombination aus beidem reflektieren (Abb. 12). Allerdings zeigten die Zellen auch unter Methionin-Restriktion eine eindeutige Stoffwechselaktivität und sind somit vital.

Die Kombination der Ergebnisse des ZytoTox-Assays unter Methionin-Restriktion und konfluenten Bedingungen, des WST1-Vitalitäts-Assays und die mikroskopische Analyse lassen einen deutlich vermehrten Zelltod als Ursache für die Abnahme der relativen Zellzahl unter Methionin-Restriktion als sehr unwahrscheinlich erscheinen – wenn überhaupt scheinen nur sehr wenige Zellen zu sterben. Viel wahrscheinlicher ist, dass die Methionin-Restriktion in den analysierten Zelllinien eine starke antiproliferative Wirkung hat.

Die Methionin-Restriktion erwies sich bereits sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien wirksam gegen Krebs (Wanders *et al.*, 2020). So konnte in verschiedenen Tiermodellen durch die Methionin-Restriktion eine Regression des Tumorwachstums erreicht werden (Kominou *et al.*, 2006, Hens *et al.*, 2016). Die Ergebnisse der Proliferationsassays über sieben Tage unter Methionin-Restriktion (Abb. 13A), die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, korrelieren mit

den Daten der bisher beschriebenen Studien. Alle untersuchten Zelllinien sprachen eindeutig auf die Methionin-Restriktion an. Da der Schwerpunkt der Forschung der Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Würzburg auf dem Plattenepithelkarzinom liegt, wurden zusätzlich vier HNSCC-Zelllinien verwendet: FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25. Die niedrigsten durch die Methionin-Restriktion erreichten, prozentualen Werte der vier HNSCC-Linien lagen im Schnitt bei $60,65 \% \pm 11,7 \%$. Als Kontrollzelllinien wurden zusätzlich die humanen Zelllinien HeLa und HaCaT, wie auch die murine Fibroblastenzelllinie L929, verwendet. Diese Zelllinien zeichnen sich durch ein deutlich besseres Ansprechen auf die Methionin-Restriktion aus. Hier führte die Methionin-Restriktion zu einer Inhibition von über 50 %. Bei der murinen Zelllinie L929 konnte unter Methionin-Restriktion bereits nach 48 h eine Inhibition von über 50 % festgestellt werden, was unter anderem ein Grund dafür ist, dass diese Zelllinie in dieser Arbeit als Modellsystem etabliert werden konnte. Die deutlich erhöhte Stoffwechselgeschwindigkeit in murinen Systemen könnte ein Grund für das gute und schnellere Ansprechen dieser Zelllinie sein. Abb. 13A zeigt in einer Zusammenfassung die antiproliferative Wirkung der Methionin-Restriktion für die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

Im Gegensatz zu den Kontrollzelllinien scheinen die HNSCC-Zelllinien den Methioninmangel zumindest teilweise kompensieren zu können und erreichen ab dem dritten Tag eine Art Plateauphase, während das Wachstum der Kontrollzelllinien auch ab dem dritten Tag kontinuierlich verlangsamt wird. Daher stellt sich die grundlegende Frage, wie es die HNSCC-Zelllinien schaffen, nach den ersten 72 h Methionin-Restriktion wieder schneller zu wachsen?

Mögliche Ursachen könnten sein, dass die Tumorzellen in der Lage sind (1) die Signale für den Low-Energy-Metabolismus zu ignorieren, oder (2) es schaffen, das fehlende Methionin zu kompensieren.

Denkbar wäre, dass die Tumorzellen Mutationen haben, wodurch sie das Fehlen der Aminosäure Methionin nicht registrieren und somit weiter proliferieren können. Zum Beispiel könnten Mutationen im Protein SAMTOR dazu führen, dass mangelndes SAM beziehungsweise Methionin von den Zellen nicht mehr registriert werden kann, wodurch das über mTOR vermittelte Zellwachstum nicht

inhibiert wird (siehe Kapitel 1.2.4, Einleitung). Demzufolge würde das Zellwachstum erst wenn gar kein oder sehr wenig Methionin zur Verfügung wäre, zum Erliegen kommen.

Zudem gibt es in der Regel in der Tumormikroumgebung eine ganze Reihe an Impulsen durch Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel Interleukine (z.B. IL-8) oder Faktoren wie EGF, IGF (siehe auch Kapitel 1.2.4, Einleitung). Aus vorherigen Untersuchungen der in dieser Arbeit analysierten Zelllinien ist bekannt, dass sie IL-8 sekretieren (Scheurer *et al.*, 2019). Die Tumorzellen sind womöglich in der Lage autokrin/parakrin so viele Wachstumsimpulse zu generieren, dass diese den inhibitorischen Effekt der Methionin-Restriktion überwiegen und mTOR massiv aktivieren, was letztlich - trotz Methioninmangel - zu einer fortgeführten Proliferation führt.

Optionen zur Kompensation des Methioninmangels wären verschiedene Wege den Methioninverbrauch zu verringern, oder die Regeneration der Aminosäure aus Abbauprodukten. So könnte zum Beispiel das intrazelluläre Methionin geschont werden, indem weniger Glutathion synthetisiert wird. Wie bereits erwähnt, wird für die Synthese von Glutathion neben Glutamat und Glycin auch Cystein benötigt. Aufgrund des engen Zusammenhangs des Stoffwechsels der beiden schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin (siehe auch Abb. 8) korreliert ein erhöhter Cysteinverbrauch mit einem erhöhten Methioninverbrauch.

Eine weitere Erklärung ist, dass, aufgrund des geringen zellulären Energieniveaus durch die Methionin-Restriktion, die Autophagie induziert wird (Madeo *et al.*, 2015, Ruckenstuhl *et al.*, 2014). Durch die Wiederverwertung von Zellstrukturen, fehlgefalteten Proteinen, aber auch ganzen Organellen wie defekten Mitochondrien, könnte über die endogenen Abbauprodukte der Proteine Methionin regeneriert werden. Die HNSCC-Zellen können diesen Mechanismus eventuell verstärkt nutzen.

Auch ein verlangsamter Proteinabbau zur Reduktion des Methioninbedarfs wäre denkbar. Proteine haben unterschiedliche Halbwertszeiten von Stunden bis Tage (Eden *et al.*, 2011). Wenn man die Halbwertszeit verlängern könnte, z.B. durch einen verlangsamten Proteinabbau, wäre die Proteinbiosynthese und somit auch

der Methioninverbrauch verringert. Die Umsetzung ist z.B. durch veränderte Ubiquitylierungen oder Sumoylierungen möglich. Die beiden Moleküle Sumo und Ubiquitin können durch Anheftung Proteine für den Abbau markieren. Sowohl der Abbau einzelner Proteine als auch von einem Großteil des Proteoms wird von der Zelle durch diesen Mechanismus auf sehr präzise Art reguliert (Hochstrasser, 2009, Hickey *et al.*, 2012). Zukünftige massenspektrometrische Untersuchungen der HNSCC-Zelllinien unter Methionin-Restriktion könnten auch für diese Fragen Antworten liefern. Allerdings bietet sich dann die massenspektrometrische Analyse des Proteoms an. Zusammenfassend ist die antiproliferative Wirkung der Methionin-Restriktion auch in den Plattenepithelzelllinien eindeutig und stellt somit einen möglichen Therapieansatz dar.

4.2 Cystein-Restriktion als Alternative zur Methionin-Restriktion

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben ist der Ansatz der Methionin-Restriktion eine vielversprechende Option zur Inhibition des Wachstums. Alle untersuchten Zelllinien - selbst die Tumorzelllinien - sprechen eindeutig mit einer verminderten Proliferation auf die Methionin-Restriktion an. Die Methionin-Restriktion lässt sich im Labor mittels Methionin-freiem Medium einfach und standardisiert durchführen und eignet sich daher auch gut zur Erhebung des metabolen Profils des durch die Methionin-Restriktion induzierten Low-Energy-Metabolismus. Allerdings lässt sich die Methionin-Restriktion als Tumorthherapie nur schwer umsetzen, da sich die Methioninzufuhr selbst durch eine strenge Diät nicht ausreichend reduzieren lässt. Das isolierte, bakterielle Enzym Methionase, welches Methionin zu alpha-Ketobutyrat, Methanethiol und Ammoniak spaltet, kann bei oraler Aufnahme in Form eines Medikamentes zu denselben Effekten führen wie eine direkte Methionin-Restriktion. Der Einsatz dieses Enzyms konnte bereits in präklinischen Studien das Tumorwachstum hemmen (Cellarier *et al.*, 2003, Tan *et al.*, 1999). Aufgrund des engen Zusammenhangs des Stoffwechsels der Aminosäuren Methionin und Cystein (siehe Abb. 8) könnte die Cystein-Restriktion eine

mögliche Alternative darstellen. Dabei gibt es im Wesentlichen zwei Wirkmechanismen. Erstens, dass Cystein selbst – genau wie Methionin – bei einer Restriktion einen Low-Energy-Metabolismus - z.B. mTOR vermittelt - induzieren kann oder zweitens, dass das fehlende Cystein aus dem vorhandenen Methionin synthetisiert wird und so indirekt über den kontinuierlich abnehmenden Methionin-Pool einen Low-Energy-Metabolismus induziert. Prinzipiell kann eine Cystein-Restriktion auf molekularer Ebene dieselben Auswirkungen haben wie die Methionin-Restriktion.

Kritisch ist jedoch, inwieweit die Aminosäuren Cystein und Methionin ineinander umgewandelt werden können. Rein energetisch ist die Umwandlung von Cystein zu Methionin extrem ungünstig und kommt laut Lehrbuch nur in Bakterien und Pflanzen vor. Allerdings gibt es bereits Studien, die beschreiben, dass eine Cystein-Supplementierung einige der vorteilhaften Veränderungen unter Methionin-Restriktion rückgängig macht (Gomez *et al.*, 2015, Perrone *et al.*, 2012). Allerdings sind die biochemischen Reaktionen und Mechanismen bis dato vollkommen unklar. Eine einfache Erklärung wäre, dass nicht das Molekül Methionin selbst durch Cystein kompensiert wird, sondern dass die verringerte Glutathionsynthese durch das Cystein direkt kompensiert werden kann.

Zusätzlich gab es in präklinischen Studien bereits Erfolge bei der pharmakologischen Inhibition der beiden Cystein-synthetisierenden Enzyme, Cystathionin- β -Synthase und Cystathionin- γ -Lyase. Durch die Hemmung dieser Enzyme konnte sowohl das Metastasierungs- als auch das Rezidivrisiko gesenkt werden und zudem die Wirkung von Standard-Chemotherapeutika, wie z.B. Cisplatin, verstärkt werden (Hellmich *et al.*, 2015). Grundsätzlich scheint eine Umsetzung der Cystein-Restriktion als Therapieoption möglich. Der klare Vorteil ist, dass man hier mit Hilfe von Inhibitoren der beiden genannten Cystein-Synthese-Enzyme medikamentös in den Stoffwechsel eingreifen kann. Bis dato sind eine ganze Reihe von Inhibitoren entwickelt worden, deren Potential innerhalb der Krebstherapie oder gar als Low-Energy-Metabolismus induzierende CRMs wenig bis gar nicht untersucht sind. Allerdings steht bisher nicht die Induktion eines Low-Energy-Metabolismus im Vordergrund, sondern die Reduktion von H₂S, welches u.a. während des Abbaus von Cystein entsteht. H₂S

kann eine Vielzahl von biologischen Prozessen beeinflussen, spielt aber auch beim Tumorwachstum durch die Förderung der Proliferation und der Angiogenese eine bedeutende Rolle (Szabo and Papapetropoulos, 2017). Cystein-Synthase-Inhibitoren könnten also multifaktoriell als Krebstherapeutikum wirksam sein.

Die Ergebnisse der Proliferationsassays (Abb. 9 und Abb. 14) zeigen, dass die Cystein-Restriktion das Wachstum der untersuchten Zelllinien nahezu im selben Ausmaß wie die Methionin-Restriktion inhibiert. Wie auch in der Literatur beschrieben scheint die Restriktion einer einzelnen Aminosäure ausreichend zu sein (Sugimura *et al.*, 1959) und die kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion führte nur zu einer marginalen Verstärkung des antiproliferativen Effekts. In weiterführenden Versuchen gilt es zu überprüfen, ob die Cystein-Restriktion auf der Ebene des Metabolismus dieselben Stoffwechselprozesse wie die Methionin-Restriktion induziert und zu einem Low-Energy-Metabolismus führt. Wenn dem so wäre, könnte eine Therapie basierend auf Cystein-Synthase-Inhibitoren oder auf Cystein-Analoga einen vielversprechenden Ansatz zur Tumorthherapie darstellen.

4.3 Zelluläre Gesamtproteinmenge unter Methionin-Restriktion

Da Methionin bei fast allen Lebewesen bei der Proteinbiosynthese als erste Aminosäure eingebaut wird, könnte man annehmen, dass sich eine Methionin-Restriktion auf die Proteinsyntheserate auswirkt und so zu einer Abnahme des zellulären Gesamtproteingehalts führt. Entgegen dieser Annahme konnte gezeigt werden, dass sich die zelluläre Gesamtproteinmenge in L929 über einen Zeitraum von fünf Tagen durch Methionin-Restriktion nicht signifikant verändert und selbst nach fünf Tagen Methionin-Restriktion um nicht mehr als den größtmöglichen Fehler von $\pm 15,8$ % abweicht.

Als Fazit dieser Versuche lässt sich festhalten, dass die zelluläre Gesamtproteinmenge durch die Methionin-Restriktion auf keinen Fall drastisch einbricht. Auch hierfür wäre die Induktion der Autophagie aufgrund der geringen zellulären Methionin-Konzentration und dem damit einhergehenden geringen zellulären Energieniveau eine mögliche Erklärung (Madeo *et al.*, 2015).

Methionin könnte in diesem Fall direkt durch die Wiederverwertung von zelleigenen Proteinen aus endogenen Abbauprodukten regeneriert werden und wäre dann als Start-Aminosäure für die Proteinsynthese wieder verfügbar, was die nahezu gleichbleibende zelluläre Gesamtproteinmenge erklären würde. Alternativ könnte allerdings auch die Halbwertszeit der Proteine erhöht werden, indem der Abbau verlangsamt wird. Die Regulation ist mittels der bereits erwähnten Moleküle SUMO und Ubiquitin möglich (Hickey *et al.*, 2012, Hochstrasser, 2009).

Anhand der verwendeten Methode, dem modifizierten Bradford-Assay, konnte allerdings lediglich die Gesamtproteinmenge bestimmt werden. Es ist nicht möglich, eine Aussage über die Proteinsyntheserate oder quantitative Unterschiede bestimmter Proteine zu treffen. Daher könnte man in weiteren Versuchen durch den Einbau von O-Propargyl-Pyromycin (OPP) und dem anschließenden Labeln mit Fluorophoren mittels Click-Chemie die Veränderung der Proteinsyntheserate unter Methionin-Restriktion genauer analysieren. Ebenfalls könnte man mittels einer intensiven Coomassie-Blau-Färbung von SDS-PAGE-Gelen und der anschließenden Verwendung eines Imaging Systems Veränderungen der Bandenintensitäten auswerten. Die einzelnen Banden eines Polyacrylamidgels entsprechen Proteinen bestimmter Größe, es könnte sein, dass die Methionin-Restriktion zu aussagekräftigen Veränderungen einzelner Banden führt. In diesem Fall könnte man die Proteine aus dem Gel extrahieren und analysieren und so Rückschlüsse auf spezifische Protein-Veränderungen durch die Methionin-Restriktion gewinnen. So könnte man die Protein-Konzentration neben dem Bradford-Assay anhand einer weiteren Methode bestimmen, was eine genauere Aussage über die zelluläre Proteinmenge unter Methionin-Restriktion zulässt. Ebenfalls geeignet wäre die auch in dieser Arbeit schon verwendete Methode der Massenspektrometrie. In diesem Fall könnte sehr spezifisch das Proteom analysiert und Aussagen über die Dynamik einzelner Proteine getroffen werden.

4.4 Metabolismus unter Methionin-Restriktion

Die massenspektrometrische Untersuchung der murinen Zelllinien L929 konnte zeigen, dass die Methionin-Restriktion auf Ebene des Metabolismus stark reflektiert wird. Die Analyse der Vielzahl an Metaboliten lieferte wertvolle neue Erkenntnisse, die Rückschlüsse über veränderte Stoffwechselwege zulassen. Die Zellen wurden sowohl unter proliferierenden wie nicht proliferierenden Bedingungen analysiert, um die beiden Situationen des Tumors – metastasierend beziehungsweise stagnierend/etabliert – auf der Ebene des Metabolismus in einem sehr vereinfachten Modell zu simulieren. Im Folgenden werden nur einige ausgewählte, besonders aussagekräftige Metabolite diskutiert. Eine Übersicht der Gesamtergebnisse ist im Appendix dargestellt.

Wie bereits erwähnt ist der intrazelluläre Gehalt nahezu aller proteinogenen Aminosäuren (bis auf Arginin, Lysin, Tyrosin, Glutamin, Valin und Cystein) unter Methionin-Restriktion vor allem unter proliferierenden Bedingungen in der Zelllinie L929 drastisch gesunken und extrazellulär bei einzelnen Aminosäuren angestiegen (siehe Abb. 18). Auf den ersten Blick wirkt diese Reaktion der Zellen auf die Methionin-Restriktion nicht logisch. Der Grund für die Sekretion der Aminosäuren im Low-Energy-Metabolismus könnte trotzdem der Energiemangel sein. Eventuell sezernieren die Zellen in diesem Zustand Aminosäuren, die im Organismus über die Leber aufgenommen werden, damit diese zu Ketosäuren - wie beispielweise Oxalacetat - umgebaut und mittels Glukoneogenese wieder zu Glukose verstoffwechselt werden können.

Die Aminosäuren Arginin, Lysin, Tyrosin und in geringerem Maße Glutamin, Valin und Cystein bilden eine Ausnahme und nehmen intrazellulär unter Methionin-Restriktion zu. Arginin ist an der NO-, der Ornithin-, der Kreatinin- und wie bereits erwähnt an der Spermidin-Synthese beteiligt (Moncada and Higgs, 1993, Madeo *et al.*, 2018, Morris, 2016). Die ketogene Aminosäure Lysin ist, wie Methionin, für die Bildung von L-Carnitin verantwortlich, was wiederum für den Fetttransport in die Mitochondrien von Bedeutung ist. Beim Lysinabbau wie auch beim Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren (Leucin, Isoleucin und Valin) entsteht außerdem Acetyl-CoA. Acetyl-CoA fungiert zum einen als Energiequelle und kann in den Citratzyklus eingeschleust werden, spielt aber auch eine entscheidende Rolle bei

Proteinacetylierungsprozessen von Histonen (Gil *et al.*, 2017). Tyrosin spielt bei der Synthese einiger anderer Metaboliten wie DOPA, Dopamin, Katecholamine, Melanin, Thyroxin und Tyramin eine Rolle. Die Aminosäure Glutamin hat im Allgemeinen eine sehr zentrale Bedeutung für den Stoffwechsel. Beim Glutaminabbau entstehen durch die Glutaminolyse im Wesentlichen das anaplerotische α -Ketoglutarat und Oxalacetat als Zwischenprodukte des Zitratzyklus (Hensley *et al.*, 2013). Die Glutaminolyse wird von Tumorzellen verstärkt genutzt. Außerdem dient Glutamin wie Glycin und Aspartat als C-Atom- und Stickstoffdonor für die Purinbiosynthese (Zhang *et al.*, 2008). Grundsätzlich sind diese Aminosäuren als wertvolle Ressourcen zu betrachten, die die Zellen unter Methionin-Restriktion bewahren. Was letztlich die primäre Ursache für die intrazelluläre Ansammlung dieser Aminosäuren im Low-Energy-Metabolismus ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Anhand der höheren Konzentration im metabolen Profil lässt sich nicht feststellen, ob die Aminosäuren lediglich gespeichert werden oder einen höheren Umsatz darstellen. Der genaue Zusammenhang muss in weiterführenden Untersuchungen erst experimentell validiert werden. Eine Möglichkeit zur Nachverfolgung des Auf-/Abbaus wären massenspektrometrische Untersuchungen mit isotope markierten Metaboliten.

Der Einfluss der Methionin-Restriktion auf die „direkt Methionin/Cystein abhängigen Metabolite“, wie GSH, GSSG, Homocystein, Homoserin, S-Adenosylhomocystein, S-Adenosylmethionin (SAM), Kreatin, Kreatinin, Carnitin und Spermidin ist ebenfalls deutlich erkennbar. Jedoch werden diese sehr unterschiedlich reguliert. Trotz des Methioninmangels nimmt die Synthese nicht bei all diesen Metaboliten konstant ab. Sowohl der SAM- als auch der Kreatinin-Gehalt steigen an. Der unter Methionin-Restriktion steigende intrazelluläre SAM-Gehalt könnte auf eine allgemeine Speicherung von SAM als zelluläre Methionin-Reserve hinweisen (siehe auch Abb. 8) (Cavuoto and Fenech, 2012). Die Kreatin-Menge hingegen nahm intrazellulär bei Methionin-Restriktion kontinuierlich ab, die Menge des Abbauprodukts Kreatinin zu. Für die Kreatin-Synthese wird neben den Aminosäuren Arginin und Glycin SAM (und für dessen Synthese Methionin) benötigt. Kreatin ist in Form von Kreatinphosphat

ein wichtiger Energieträger und auch bei der Synthese von ATP aus ADP von Bedeutung. In der Erholungsphase wird das Kreatin hauptsächlich über eine membrangetragene mitochondriale Kreatinkinase rephosphoryliert. Ein zunehmender Kreatingehalt könnte auf einen höheren Bedarf beziehungsweise Umsatz an Kreatin und eine Verschiebung der ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung hinweisen (Wallimann *et al.*, 2011). Indirekt wird die Kreatin-Menge eventuell auch über das gespeicherte SAM reguliert, wenn dies nicht mehr für die Synthese zur Verfügung gestellt wird.

Ein anderes Beispiel ist Acetoacetat. Ein energiereiches Molekül, das zum einen beim Abbau der ketogenen Aminosäure Lysin entsteht und in erhöhter Konzentration außerdem ein Zeichen dafür ist, dass sich die Stoffwechsellast auf den Fettstoffwechsel verschiebt. Der intrazelluläre Acetoacetatgehalt steigt kontinuierlich an (siehe Abb. 21), ein Teil wird von L929 unter Methionin-Restriktion sogar noch sezerniert (siehe Appendix). Bedeutend ist ebenfalls, dass der Gehalt an Hydroxybutyrat unter Methionin-Restriktion nicht steigt (siehe Appendix). Zusammen mit Aceton bilden Hydroxybutyrat und Acetoacetat die Gruppe der Ketokörper, die bei längerem Glukosemangel im Hungerstoffwechsel gebildet werden und eine ganz wesentliche Änderung im Energiestoffwechsel im Organismus bedeuten. Der Low-Energy-Metabolismus und der Hungerstoffwechsel unterscheiden sich also deutlich.

Neben der Sekretion von Aminosäuren oder Acetoacetat, die an anderer Stelle als Energiequelle genutzt werden, können die sezernierten Metabolite auch Signalmoleküle für den energetischen Zustand der Zelle sein. So ist beispielsweise Spermidin ein Molekül, das eine besondere Rolle im Energiestoffwechsel spielt. Die Spermidinmenge ist ein Indikator für den energetischen Zustand der Zelle. Wenn die intrazelluläre Menge an Spermidin in einer Zelle – wie in L929 unter Methionin-Restriktion – sinkt, wird die Proteinsynthese drastisch reduziert und die Zellproliferation gehemmt (Morris, 2016). Ein Faktor, der die intrazelluläre Spermidin-Synthese hemmt, ist der steigende SAM-Gehalt (Sečkutě *et al.*, 2011). Dem entgegen steht die extrazelluläre Spermidin-Konzentration (siehe Appendix), die bei L929 unter Methionin-

Restriktion steigt, was für die umliegenden Zellen ein Signal für einen Low-Energy-Metabolismus sein könnte. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass aufgenommenes extrazelluläres Spermidin zur Induktion der Autophagie führt (Chen *et al.*, 2018). Allerdings ist nicht beschrieben, wie die Zelle zwischen intra- und extrazellulärem Spermidin unterscheidet, da das aufgenommene Spermidin ja die intrazelluläre Konzentration ansteigen lässt und somit eigentlich dem intrazellulären Effekt der Inhibition der Proteinsynthese und Proliferation entgegenwirkt. Möglich wäre, dass Spermidin über spezifische Rezeptoren aufgenommen wird und/oder über einen vesikulären Transport in die Zelle gelangt und von dort die Autophagie induziert, somit nicht in den zytoplasmatischen Bereich der Zelle gelangt. Auch wären diverse Modifikationen des Spermidin während der Aufnahme denkbar, z.B. durch Acetylierungen, die Spermidin in ein Autophagie-induzierendes Molekül transformieren.

Die verminderte Spermidin-Synthese ist auch im Zusammenhang mit der Aminosäure Arginin (Kapitel 3.2.4.1) zu sehen, welche im Gegensatz zu den meisten anderen proteinogenen Aminosäuren intrazellulär in höherer Konzentration vorhanden ist. Da unter Methionin-Restriktion weniger Spermidin synthetisiert wird, wird auch weniger Putrescin verbraucht, was wiederum aus Ornithin synthetisiert wird. Arginin wird wiederum aus Ornithin gebildet, was einer der anaplerotischen Reaktionen des Citratzyklus entspricht. So lässt sich der steigende Arginin-, Argininosuccinat- und Citrullin-Gehalt unter Restriktion als Reservebildung für stoffwechselaktivere Zeiten interpretieren.

Ein weiterer Indikator für den Low-Energy-Metabolismus unter Methionin-Restriktion sind die Kohlenhydrate. So konnte beobachtet werden, dass sich zum Beispiel Fructose-1,6-bisphosphat intrazellulär nach 4 Tagen Methionin-Restriktion massiv ansammelt (siehe Appendix). Fructose-1,6-bisphosphat ist sowohl bei der Glykolyse als auch bei der Glukoneogenese von zentraler Bedeutung. Die Metabolite und Nebenprodukte der Glykolyse sind normalerweise im metabolischen Fluss, man könnte also von einem gesteigerten Auf-/Abbau ausgehen. Zudem nahm die Konzentration an UDP-Glukose, einer aktivierten Form der Glukose, welche als Startmolekül zur Glykogen-Synthese benötigt wird, intrazellulär bereits ab dem ersten Tag zu. Eine mögliche Erklärung

hierfür wäre ein – aufgrund des geringen Energieniveaus – gesteigerter Glykogenaufbau. Das Polysaccharid Glykogen besteht aus Glukose-Monomeren und dient als Energiereserve. Allerdings bedarf dies weiterer Analysen, da die Speicherung der Glukose im Low-Energy-Metabolismus auf den ersten Blick nicht vollständig logisch erscheint. Vielleicht bildet die Zelle aber tatsächlich, da sie den Fettstoffwechsel aktiviert hat und solange dies noch möglich ist, einen Glukose-Pool als Notfall-Reserve.

Auch an Molekülen wie ADP, ATP, NAD^+ , NADH, NADP^+ und NADPH, die als zelluläre Energiewährung zu verstehen sind, wurde der Low-Energy-Metabolismus deutlich. Die intrazelluläre ADP- und ATP-Konzentration nahm mit dem zeitlichen Verlauf der Restriktion kontinuierlich ab und das NAD^+ /NADH-Verhältnis erhöhte sich. Die Auswirkung des veränderten AMP/ATP-Spiegels und des erhöhten NAD^+ /NADH-Verhältnisses durch die Methionin-Restriktion sind wie die wichtigsten molekularen Mechanismen des Low-Energy-Metabolismus (mTOR, AMPK und Sirtuine) in Kapitel 1.2.4 (Abb. 4) beschrieben und dargestellt.

So wird durch die verminderte ATP-Konzentration durch die Methionin-Restriktion die Aktivität von mTOR AMPK-vermittelt verringert, was zur Inhibition von Wachstum und Zellproliferation führt (Weichhart, 2018). Ein weiterer Effekt, ausgelöst durch die Methionin-Restriktion und dem erhöhten NAD^+ /NADH-Verhältnis, ist die Aktivierung der Sirtuine (Alves-Fernandes and Jasiulionis, 2019, Fang *et al.*, 2017). Im Gegensatz dazu haben die Zellen unter Vollmedium sowohl unter proliferativen wie auch konfluenten Bedingungen ein hohen intrazellulären ATP-Level. Ein anderes Beispiel ist Spermidin, das wie bereits erwähnt ein guter Marker für einen Low-Energy-Metabolismus ist (Morris, 2016). Die jeweiligen Verläufe sind unter proliferativen und konfluenten Bedingungen für die unterschiedlichen Bedingungen identisch. Das heißt, das Spermidin-Level bleibt auch bei konfluenten Bedingungen im Vollmedium hoch. Die Zellen bleiben also auf eine eventuelle Proliferation vorbereitet. Auffällig ist, dass die Konfluenz per se **nicht** zu einem dem Low Energy vergleichbaren Metabolismus führt. Obwohl die Zelle aufgrund der Kontaktinhibition nicht mehr proliferiert, der Energie- und Metabolitenbedarf also sinkt, bleibt die Zelle unter normalen

Bedingungen im High-Energy-Metabolismus. Der Low-Energy-Metabolismus ist also ein spezieller Metabolismus, der unter proliferativen wie auch konfluenten Bedingungen induziert werden kann.

Die Methionin-Restriktion führte bei den Zellen zu einer Situation, in der Wachstum und Proliferation drastisch reduziert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Plattenepithel-Krebszellen hingegen setzen den durch Methionin-Restriktion induzierten Low-Energy-Metabolismus bedeutend schlechter um als z.B. die Zelllinien L929 oder HeLa. Die HNSCC-Zelllinien lassen sich scheinbar nicht gleichermaßen in einen Low-Energy-Metabolismus versetzen. Sie zeigen somit typische Charakteristika, dass sie unter mehr oder weniger allen zellulären Bedingungen wachsen und proliferieren, indem sie die extrinsischen und intrinsischen Signale so weit möglich ignorieren und/oder kompensieren. Die enorme „egoistische Art“ von Krebszellen ist eine große Chance, sie anzugreifen. Interessant und von großer Bedeutung werden weiterführende Arbeiten sein, die die metabolischen Fingerabdrücke der Tumorzellen mit denen der Kontrollzellen unter Methionin-Restriktion vergleichen, um so potentielle Unterschiede und daraus folgend Angriffspunkte zu identifizieren.

Ein gutes Beispiel für solch einen Angriffspunkt bieten die Erkenntnisse aus dieser Arbeit über die intra- und extrazellulären Konzentrationen der proteinogenen Aminosäuren unter Methionin-Restriktion. Der Aminosäurestoffwechsel und auf diese Weise die Hemmung membranbasierter Aminosäuretransporter haben im letzten Jahrzehnt eine große Relevanz erhalten (Lieu *et al.*, 2020).

Was passiert, wenn man die Methionin-Restriktion mit einem Aminosäuretransport-Inhibitor (zum Beispiel für Arginin oder Glutamin) in der Krebstherapie kombiniert? Durch die Methionin-Restriktion schafft man zwei Extreme: die gesunden Körperzellen im Low-Energy-Metabolismus und die Tumorzellen, denen es gelingt, die Signale zu ignorieren und im High-Energy-Metabolismus zu bleiben. Glutamin hat eine große Relevanz für Tumorzellen und hauptsächlich für das Wachstum (Hensley *et al.*, 2013). In L929 nimmt der Glutamin-Gehalt im Low-Energy-Metabolismus zu, die gesunden Zellen scheinen also nicht von extrazellulärem Glutamin abhängig zu sein bzw.

verbrauchen es nicht, sondern speichern es. Ein Glutamintransport-Inhibitor könnte so möglicherweise den Tumor im High-Energy-Metabolismus treffen, jedoch nicht die gesunden Zellen im Low-Energy-Metabolismus. Beispielsweise führte die pharmakologische Blockade des membranständigen Glutamintransporters ASCT2 mit dem pharmakologischen Inhibitor V-9302 zu einem abgeschwächten Wachstum und einer verminderten Proliferation von Krebszellen sowie einem erhöhten Zelltod der Tumorzellen (Schulte *et al.*, 2018). Denkbar wäre auch der Einsatz von Arginin- oder Glutamin-Analoga beziehungsweise allgemein der Einsatz von Aminosäure-Analoga zur Tumorthherapie (Sasamura *et al.*, 1998, Guo *et al.*, 1996).

Ein ähnliches Prinzip, das bereits Anwendung in der Tumorthherapie findet, ist extremes Fasten (also eine extreme und schnelle Art der Kalorien-Restriktion) vor der Chemotherapie (z.B. mit Cisplatin) (Longo and Mattson, 2014). So kann neben der Verträglichkeit auch die Effizienz der Therapie gesteigert werden, da Cisplatin vor allem eine Wirkung auf sich teilende Zellen hat. Die gesunden Körperzellen befinden sich durch die Kalorien-Restriktion im Gegensatz zu den weiter proliferierenden Tumorzellen im Low-Energy-Metabolismus und werden so geschont und geschützt.

4.5 Metaboler Fingerabdruck der Methionin-Restriktion

Anhand des metabolen Profils des durch die Methionin-Restriktion induzierten Low-Energy-Metabolismus, soll zukünftig effizient überprüft werden können, ob ein Low-Energy-Metabolismus vorliegt. Dazu sollen die zu einem bestimmten Zeitpunkt auftretenden Unterschiede als Standard bzw. metabolischer Fingerabdruck definiert werden. So sollen dann beispielsweise die bereits erwähnten CRMs auf ihre Wirksamkeit getestet werden, indem das durch CRM induzierte metabolische Profil mit dem durch Methionin-Restriktion induzierten verglichen und auf Gemeinsamkeiten analysiert wird.

Die Methionin-Restriktion führte bereits zum zweiten Messzeitpunkt nach 48 h zu signifikanten Unterschieden des metabolen Profils. So lassen sich zum Beispiel bei ADP, ATP, NAD⁺ deutliche Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle erkennen (siehe Abb. 23). Mit dem zeitlichen Verlauf nimmt sowohl die Signifikanz als auch

die Anzahl der unterschiedlichen Metabolite stetig zu. Die Anzahl von ca. 50 Metaboliten gibt die Möglichkeit, dieses Profil mit anderen Profilen zu vergleichen und anhand der Anzahl der übereinstimmenden Tendenzen eine differenzierte Aussage zu treffen, ob es sich um einen Low-Energy-Metabolismus handelt oder nicht. Allerdings benötigt man in diesem Fall grundsätzlich die Analyse per Massenspektrometrie, eine Methode, die nicht in jedem Labor zur Verfügung steht und zusätzlich eines gewissen Aufwandes bedarf. Effizienter ist eine Reduktion der Metabolite auf eine geringere Anzahl, die grundsätzlich hohe Aussagekraft haben.

In einem ersten Ansatz sind hierfür die Metabolite Acetoacetat, Spermidin, Kreatin, Glutathion, das Verhältnis von ADP/ATP, UDP-Glucose und die Pantothersäure ausgesucht worden. Diese Metabolite lassen sich zum Teil durch einfache Kits beziehungsweise klinisch-chemische Laboruntersuchungen messen, sodass auf die kosten- und zeitaufwändigen massenspektrometrischen Untersuchungen verzichtet werden kann. Acetoacetat fungiert bei der Analyse des kleinen Fußabdrucks als Stellvertreter des Fettstoffwechsels (Abb. 21), Spermidin als Regulator der Proteinsynthese (Abb. 20), Kreatin wie auch das Verhältnis von ADP/ATP als Energiesensor (Abb. 20 und Abb. 22) und GSSG, dessen Synthese direkt Methionin bzw. Cystein abhängig ist, als indirekter Methioninsensor (Abb. 20). Dass sich die relativen Stoffmengen dieser Metabolite unter Methionin-Restriktion sowohl bei konfluenten als auch bei proliferativen Bedingungen im selben Maße verändern, zeigt, dass es sich bei Spermidin, Acetoacetat, Kreatin und GSSG tatsächlich um Low-Energy-Marker handelt (Abb. 25).

4.6 Aminosäure-Analoga als potentielle Therapieoption

Kalorienrestriktionsmimetika (CRMs) und der durch diese Moleküle induzierte Low-Energy-Metabolismus stellen, wie in Kapitel 1.3.1 bereits beschrieben, eine vielversprechende Behandlungsoption dar.

In dieser Arbeit wurden einige Aminosäure-Analoga (Abb. 27) auf ihr Potential als CRM zunächst an der murinen Zelllinie L929 getestet (Abb. 28). Einige Moleküle hatten nur eine geringe beziehungsweise keine Wirkung auf die relative

Zellzahl dieser Zelllinie und wurden daher nicht weiterverfolgt. Die aufgrund der Zellzahlregression als erfolgreich eingestuft Moleküle – L- γ -Azidohomoalanin und F_{moc}-L-Methionin – wurden anhand einfacher Zytotoxizitätsassays ebenfalls an den humanen Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9, SCC25, HeLa und HaCaT getestet.

L- γ -Azidohomoalanin führte neben der murinen Zelllinie L929 unter proliferativen Bedingungen bei drei weiteren Zelllinien - HeLa, Detroit562 und SCC9 - zu einer signifikanten Verminderung der Zellzahl (Abb. 30). Die Zugabe von L- γ -Azidohomoalanin unter konfluenten Bedingungen bewirkte nur bei der Zelllinie HeLa eine Zellzahlreduktion (Abb. 32).

Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Responsivität der Zelllinien auf die Analoga sind ABC-Transporter und Kanäle. ABC-Transporter sind eine Familie von Membranproteinen, die eine ATP-bindende Kasette besitzen und bestimmte Substrate aktiv über die Membran transportieren. Kanäle sind Membranproteine, über die, im Gegensatz zu Transportern, ein passiver Austausch von Molekülen entlang des Konzentrationsgradienten möglich ist. Die Zelle könnte das Analogon über ABC-Transporter wieder aus der Zelle raus pumpen und über Kanäle könnten natürlich auch unterschiedliche Mengen aufgenommen werden (Lage, 2008).

F_{moc}-L-Methionin führte bei allen untersuchten Zelllinien unter proliferativen Bedingungen zu einer deutlichen Verminderung der Zellzahl (Abb. 31). Jedoch bewirkte F_{moc}-L-Methionin auch unter konfluenten Bedingungen bei allen analysierten Zelllinien eine deutliche Abnahme der relativen Zellzahl, weshalb nicht auszuschließen ist, dass es aufgrund einer zytotoxischen Wirkung zu einem vermehrten Zelltod kommt (Abb. 33). Ob die analysierten Zelllinien grundsätzlich auf die Zugabe der potentiellen Analoga ansprechen, wurde bisher jedoch nur in hohen Dosen getestet (siehe Tab. 9, Tab. 10 und Tab. 11), was auch eine Ursache für die potentiell toxische Wirkung von F_{moc}-L-Methionin sein könnte. In weiteren Versuchen gilt es, das Wirkspektrum genauer zu analysieren und herauszufinden, ob eine geringere Dosis möglicherweise antiproliferativ, aber nicht toxisch wirkt. So wäre eine Versuchsdurchführung mit F_{moc}-L-Methionin in

einer Verdünnungsreihe unter konfluenten Bedingungen sinnvoll, wie sie bereits für L929 durchgeführt wurde (siehe Abb. 29). Mögliche alternative Testverfahren, um die Zytotoxizität zu überprüfen, wären der Neutralrot(NRU)-Test, der MTT-Test und der Trypanblau-Test. Um die Art des Zelltodes zu untersuchen, eignen sich u.a. durchflusszytometrische Analysen (wie z.B. FACS) oder Apoptose-Assays wie die TUNEL-Methode (Darstellung des Zellkerns von apoptotischen Zellen) oder der Annexin-V-Assay (van Engeland *et al.*, 1998, Sgonc and Gruber, 1998). Zur gleichzeitigen Bestimmung der drei Parameter Zellvitalität, Zytotoxizität und Apoptose eignet sich der ApoTox-Glo-Assay (Orbach *et al.*, 2018). Zudem sollten die Analoga auch hinsichtlich der möglichen Inhibition der Proteinbiosynthese ausführlicher analysiert werden.

Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, ist das Konzept der CRM per se wirksam. Neben Metformin (Madeo *et al.*, 2019), einem bereits zugelassenem Diabetes Medikament, sind auch D-Aminosäuren (Sasamura *et al.*, 1998), wie Ethionin (Guo *et al.*, 1996), erfolgreich eingesetzte Moleküle. Positiv zu bewerten ist, dass die bisher getesteten Aminosäureanaloga nicht nur im murinen System eine Wirkung erzielen, sondern dass auch die humanen Kontrollzelllinien wie auch die HNSCC-Zelllinien auf die Analoga ansprechen. Diese ersten Versuche konnten zeigen, dass auch das Prinzip der Aminosäure-Analoga als CRM zu funktionieren scheint. Bereits zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich sagen, dass L- γ -Azidohomoalanin grundsätzlich Potential als CRM zu haben scheint. Die durch L- γ -Azidohomoalanin veränderten Stoffwechselprozesse sollen unter anderem durch massenspektrometrische Untersuchungen und anhand des im Vorherigen beschriebenen metabolischen Fingerabdrucks des Low-Energy-Metabolismus besser verstanden und analysiert werden.

4.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl die Methionin- als auch die Cystein-Restriktion mögliche Therapieoptionen im Plattenepithelkarzinom darstellen. Anhand der bisherigen massenspektrometrischen Untersuchungen lässt sich bereits sagen, dass die Methionin-Restriktion auf Ebene des Metabolismus der murinen Zelllinie L929 deutlich reflektiert wird und zu massiven

Stoffwechselunterschieden führt. Die Ergebnisse sollen für zukünftige massenspektrometrische Untersuchungen der Tumorzelllinien unter Methionin-Restriktion als Referenzwert dienen, um Unterschiede des Stoffwechsels und mögliche Angriffspunkte für eine Tumorthherapie identifizieren zu können.

Um das metabolische Profil des durch die Methionin-Restriktion induzierten Low-Energy-Metabolismus eindeutig von dem eines Hungerstoffwechsels abzugrenzen, könnte man zum Beispiel durch glucosearmes oder glucosefreies Medium einen Hungerstoffwechsel induzieren und die massenspektrometrischen Ergebnisse mit denen in dieser Arbeit erstellten Profilen vergleichen. In der katabolen Stoffwechsellaage bei Nahrungsmangel werden in der Regel zunächst die Kohlenhydrate und Lipide in Form von Glykogen und subkutanem Fettgewebe aufgebraucht, bevor anschließend auch Proteine aus der Muskelmasse metabolisiert werden. In der Theorie sollte sich der Metabolismus dieser beiden Situationen deutlich unterscheiden. Aufgrund der katabolen Stoffwechsellaage im Hungerstoffwechsel würde man unter Glukose-Restriktion eine erhöhte Menge der Ketokörper Acetoacetat, Hydroxybutyrat und Aceton erwarten. Unter Methionin-Restriktion ist zum Beispiel nur der Ketokörper Acetoacetat, welcher ein Anzeichen für den verstärkten Fettstoffwechsel ist, in größerer Menge vorhanden, was ein Beleg dafür ist, dass durch die Methionin-Restriktion ein Low-Energy-Metabolismus und kein Hungerstoffwechsel induziert wird.

Neben der Aminosäure-Restriktion könnten auch geeignete CRMs einen Low-Energy-Metabolismus induzieren. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass das Prinzip der Zellzahlreduktion durch Aminosäure-Analoga auch bei den Tumorzelllinien grundsätzlich zu funktionieren scheint und somit eine mögliche Tumorthherapie darstellt, die definitiv weiterverfolgt werden sollte. Da anhand der bisherigen Ergebnisse jedoch nicht auszuschließen ist, dass F_{moc} -L-Methionin zytotoxisch ist und die durch L- γ -Azidohomoalanin erreichte Wirksamkeit als nicht besonders hoch einzustufen ist, sollten weitere Untersuchungen bezüglich Wirkweise und Wirkspektrum dieser Analoga durchgeführt werden. Zudem sollte nach alternativen, möglicherweise effizienteren CRMs gesucht werden. In Kapitel 1.3.1

wurde bereits ausführlicher auf das Konzept der CRMs eingegangen. Die dort beschriebene Studie von Madeo und Kollegen, die 2019 in *Cell Metabolism* publiziert wurde, untersuchte neben Rapamycin, Metformin und Resveratrol (und andere Sirt1-Aktivatoren) auch Spermidin, Aspirin und (Poly)phenole und konnte eine Wirksamkeit einiger dieser Moleküle sowohl in Mäusen als auch im Menschen nachweisen (Madeo *et al.*, 2019).

Basierend auf dem Prinzip des Warburg-Effekts lag bisher der Fokus der Untersuchung des veränderten Metabolismus von Tumorzellen auf dem Kohlenhydratstoffwechsel, dem Citratzyklus und dem Pentosephosphatweg. Aktuelle Studien messen nun dem Aminosäurestoffwechsel als potentiellen Angriffspunkt für die therapeutische Intervention eine höhere Bedeutung bei (Lieu *et al.*, 2020). Aminosäuren werden vor allem als Substrat für die Proteinbiosynthese gebraucht zur Generierung der Zellmasse und haben daher eine große Bedeutung für proliferierende Tumorzellen (Hosios *et al.*, 2016). Auch bei der Kommunikation des Tumors mit dem direkt umgebenden Gewebe scheinen Aminosäuren von Relevanz zu sein (Vettore *et al.*, 2020). Lange Zeit wurde angenommen, dass D-Aminosäuren im menschlichen Körper nicht vorhanden sind oder keine Funktion haben, mittlerweile werden sie aber verstärkt sowohl mit physiologischen als auch pathologischen Prozessen, unter anderem Krebs, in Verbindung gebracht (Bastings *et al.*, 2019).

D-Aminosäuren haben einen inhibitorischen Einfluss auf das Tumorwachstum (Sasamura *et al.*, 1998) und sind daher vielversprechende CRMs. Im Prinzip wäre ein Eingreifen in den Aminosäurestoffwechsel auf verschiedenen Ebenen möglich – daher könnten Analoga aller Aminosäurezwischenprodukte wie zum Beispiel Oxalacetat-Analoga aber auch D-Aminosäuren eingesetzt werden und sollten neben den bereits erwähnten Molekülen auf ihr Potential als CRM getestet werden. Anhand des im vorherigen Kapitel (4.4.) beschriebenen metabolischen Fuß- und Fingerabdrucks des Low-Energy-Metabolismus wird es künftig möglich sein, die Wirksamkeit potentieller Analoga als CRM effizient und einfach in dem Modellsystem L929 zu testen.

Neben der Analyse potentieller CRMs, der Cystein-Restriktion und der HNSCC-Zelllinien unter Methionin-Restriktion wären auch metabolische Flussanalysen

(MFA) als weiterführende Untersuchungen denkbar. Da die relativen Mengen einzelner Metabolite nur begrenzte Aussagen über deren Stoffwechselbedeutung zulassen, könnte man besonders aussagekräftige Metabolite wie zum Beispiel Acetoacetat, Spermidin und Kreatinin zudem mittels MFA durch den Einsatz von stabilen Isotopen-markierter Moleküle verfolgen. Anhand dieser Methode könnte man diese Moleküle und die damit verbundenen Stoffwechselprozesse genauer analysieren und so weitere Angriffspunkte im Stoffwechsel der HNSCC-Zelllinien identifizieren.

5 Zusammenfassung

Die Krebstherapie und Behandlung von Tumoren stellt für die moderne Medizin auch in Zukunft eine enorme Herausforderung dar. Trotz intensiver Forschung konnten in den letzten Jahrzehnten zwar zunehmend Fortschritte erzielt werden, allerdings muss das Spektrum an neuen Therapieformen und Möglichkeiten kontinuierlich erweitert werden. In den letzten Jahren haben die Kalorienrestriktion sowie die Aminosäuren- und Proteinrestriktion zunehmend an Bedeutung gewonnen, da sie einen erheblichen positiven Einfluss auf die Entstehung von altersassoziierten Erkrankungen wie z.B. Krebs haben. Allen Formen gemeinsam ist die Induktion eines Low-Energy-Metabolismus, der die Zellen in einen antiproliferativen und selbst-regenerierenden Zustand versetzt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Methionin-Restriktion als eine Form der Aminosäurerestriktion sich grundsätzlich als Therapieform im Plattenepithelkarzinom (HNSCC) eignet. Zusätzlich sollte ein einfaches zelluläres Modellsystem etabliert werden, das auf metaboler Ebene die Charakterisierung und Analyse des Low-Energy-Metabolismus ermöglicht. Es konnte aufgezeigt werden, dass die Methionin-Restriktion eine effektive Methode ist, um die Proliferation ausgesuchter Zelllinien des HNSCC zu inhibieren. Des Weiteren konnte aufgezeigt werden, dass der Einsatz von Aminosäure-Analoga eine weitere Möglichkeit darstellt, auf die Proliferation von Tumorzellen Einfluss zu nehmen. Die massenspektrometrische Analyse der murinen Zelllinie L929 mittels LC/MS lieferte über einen Zeitraum von 5 Tagen ein detailliertes Bild des Stoffwechsels von mehr als 150 Metaboliten unter Methionin-Restriktion. Durch die Definition eines charakteristischen Fingerabdrucks nach 48 h und eines nur wenige Metabolite umfassenden Fußabdrucks konnte ein murines Modellsystem etabliert werden, dass die Analyse von potentiellen Wirkstoffen, u.a. sogenannten caloric restriction mimetics, ermöglicht.

6 Literatur-/Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis

- AARSTAD, H. J., AARSTAD, A. K. H., BIRKHAUG, E. J., BRU, E. & OLOFSSON, J. 2003. The personality and quality of life in HNSCC patients following treatment. *European Journal of Cancer*, 39, 1852-1860.
- ABLES, G. P., HENS, J. R. & NICHENAMETLA, S. N. 2016. Methionine restriction beyond life-span extension. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1363, 68-79.
- ALVES-FERNANDES, D. K. & JASIULIONIS, M. G. 2019. The Role of SIRT1 on DNA Damage Response and Epigenetic Alterations in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 20, 3153.
- BALL, Z. B., BARNES, R. H. & VISSCHER, M. B. 1947. The effects of dietary caloric restriction on maturity and senescence, with particular reference to fertility and longevity. *The American Journal of Physiology*, 150, 511-519.
- BASELGA, J. 2001. The EGFR as a target for anticancer therapy—focus on cetuximab. *European Journal of Cancer*, 37, 16-22.
- BASTINGS, J., VAN EIJK, H. M., OLDE DAMINK, S. W. & RENSEN, S. S. 2019. d-amino Acids in Health and Disease: A Focus on Cancer. *Nutrients*, 11.
- BHATTACHARYYA, S. & VARSHNEY, U. 2016. Evolution of initiator tRNAs and selection of methionine as the initiating amino acid. *RNA biology*, 13, 810-819.
- BRANDT, B. & PETRIDES, P. E. 2014. Grundlagen der Tumorentstehung. In: HEINRICH, P. C., MÜLLER, M. & GRAEVE, L. (eds.) *Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie*. 9. ed. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
- CABREIRO, F., AU, C., LEUNG, K.-Y., VERGARA-IRIGARAY, N., COCHEMÉ, H. M., NOORI, T., WEINKOVE, D., SCHUSTER, E., GREENE, N. D. E. & GEMS, D. 2013. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell*, 153, 228-239.
- CAMPBELL, J. M., BELLMAN, S. M., STEPHENSON, M. D. & LISY, K. 2017. Metformin reduces all-cause mortality and diseases of ageing independent of its effect on diabetes control: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*, 40, 31-44.
- CAO, Y., LIU, S., LIU, K., ABBASI, I. H. R., CAI, C. & YAO, J. 2019. Molecular mechanisms relating to amino acid regulation of protein synthesis. *Nutrition Research Reviews*, 32, 183-191.
- CAVUOTO, P. & FENECH, M. F. 2012. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treatment Reviews*, 38, 726-736.
- CELLARIER, E., DURANDO, X., VASSON, M. P., FARGES, M. C., DEMIDEN, A., MAURIZIS, J. C., MADELMONT, J. C. & CHOLLET, P. 2003. Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*, 29, 489-499.

- CHATURVEDI, S., HOFFMAN, R. & BERTINO, J. 2018. Exploiting Methionine Restriction for Cancer Treatment. *Biochemical Pharmacology*, 154, 170-173.
- CHEN, Y., ZHUANG, H., CHEN, X., SHI, Z. & WANG, X. 2018. Spermidine-induced growth inhibition and apoptosis via autophagic activation in cervical cancer. *Oncol Rep*, 39, 2845-2854.
- CHOW, L. Q. M. 2020. Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382, 60-72.
- CHUANG, S.-C., JENAB, M., HECK, J. E., BOSETTI, C., TALAMINI, R., MATSUO, K., CASTELLSAGUE, X., FRANCESCHI, S., HERRERO, R., WINN, D. M., LA VECCHIA, C., MORGENSTERN, H., ZHANG, Z.-F., LEVI, F., DAL MASO, L., KELSEY, K., MCCLEAN, M. D., VAUGHAN, T., LAZARUS, P., MUSCAT, J., RAMROTH, H., CHEN, C., SCHWARTZ, S. M., ELUF-NETO, J., HAYES, R. B., PURDUE, M., BOCCIA, S., CADONI, G., ZARIDZE, D., KOIFMAN, S., CURADO, M. P., AHRENS, W., BENHAMOU, S., MATOS, E., LAGIOU, P., SZESZENIA-DABROWSKA, N., OLSHAN, A. F., FERNANDEZ, L., MENEZES, A., AGUDO, A., DAUDT, A. W., MERLETTI, F., MACFARLANE, G. J., KJAERHEIM, K., MATES, D., HOLCATOVA, I., SCHANTZ, S., YU, G.-P., SIMONATO, L., BRENNER, H., MUELLER, H., CONWAY, D. I., THOMSON, P., FABIANOVA, E., ZNAOR, A., RUDNAI, P., HEALY, C. M., FERRO, G., BRENNAN, P., BOFFETTA, P. & HASHIBE, M. 2012. Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer causes & control : CCC*, 23, 69-88.
- CHUNG THONG, L., BLERINA, K. & MÁRTA, K. 2010. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *Journal of Molecular Endocrinology*, 44, 87-97.
- COLMAN, R. J., BEASLEY, T. M., KEMNITZ, J. W., JOHNSON, S. C., WEINDRUCH, R. & ANDERSON, R. M. 2014. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nature communications*, 5, 3557-3557.
- CURADO, M. P. & BOYLE, P. 2013. Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol. *Current Opinion in Oncology*, 25, 229-234.
- DANIEL, H. & WENZEL, U. 2014a. Energiebilanz und Ernährungszustand. In: HEINRICH, P. C., MÜLLER, M. & GRAEVE, L. (eds.) *Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie*. 9. ed. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
- DANIEL, H. & WENZEL, U. 2014b. Makronährstoffe und ihre Bedeutung. In: HEINRICH, P. C., MÜLLER, M. & GRAEVE, L. (eds.) *Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie*. 9. ed. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
- DIETERICH, D. C., LINK, A. J., GRAUMANN, J., TIRRELL, D. A. & SCHUMAN, E. M. 2006. Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 9482.
- EDEN, E., GEVA-ZATORSKY, N., ISSAEVA, I., COHEN, A., DEKEL, E., DANON, T., COHEN, L., MAYO, A. & ALON, U. 2011. Proteome half-life dynamics in living human cells. *Science*, 331, 764-8.
- EGAN, D. F., SHACKELFORD, D. B., MIHAYLOVA, M. M., GELINO, S., KOHNZ, R. A., MAIR, W., VASQUEZ, D. S., JOSHI, A., GWINN, D. M., TAYLOR, R., ASARA, J. M., FITZPATRICK, J., DILLIN, A., VIOLLET, B., KUNDU, M., HANSEN, M. & SHAW, R. J.

2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science (New York, N.Y.)*, 331, 456-461.
- EHRENFELD, M., PREIN, J. & JUNDT, G. 2011. Tumoren und tumorähnliche Läsionen im Mund-Kiefer-Gesichts-Bereich. In: SCHWENZER, N. & EHRENFELD, M. (eds.) *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde - Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. 4. ed. Stuttgart/New York: Thieme-Verlag.
- EISENBERG, T., ABDELLATIF, M., SCHROEDER, S., PRIMESSNIG, U., STEKOVIC, S., PENDL, T., HARGER, A., SCHIPKE, J., ZIMMERMANN, A., SCHMIDT, A., TONG, M., RUCKENSTUHL, C., DAMMBRUECK, C., GROSS, A. S., HERBST, V., MAGNES, C., TRAUSINGER, G., NARATH, S., MEINITZER, A., HU, Z., KIRSCH, A., ELLER, K., CARMONA-GUTIERREZ, D., BÜTTNER, S., PIETROCOLA, F., KNITTELFELDER, O., SCHREPFER, E., ROCKENFELLER, P., SIMONINI, C., RAHN, A., HORSCH, M., MORETH, K., BECKERS, J., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., NEFF, F., JANIK, D., RATHKOLB, B., ROZMAN, J., DE ANGELIS, M. H., MOUSTAFA, T., HAEMMERLE, G., MAYR, M., WILLEIT, P., VON FRIELING-SALEWSKY, M., PIESKE, B., SCORRANO, L., PIEBER, T., PECHLANER, R., WILLEIT, J., SIGRIST, S. J., LINKE, W. A., MÜHLFELD, C., SADOSHIMA, J., DENGJEL, J., KIECHL, S., KROEMER, G., SEDEJ, S. & MADEO, F. 2016. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nature medicine*, 22, 1428-1438.
- ESCOBAR, K. A., COLE, N. H., MERMIER, C. M. & VANDUSSELDORP, T. A. 2019. Autophagy and aging: Maintaining the proteome through exercise and caloric restriction. *Aging cell*, 18, e12876-e12876.
- FANG, E. F., LAUTRUP, S., HOU, Y., DEMAREST, T. G., CROTEAU, D. L., MATTSON, M. P. & BOHR, V. A. 2017. NAD(+) in Aging: Molecular Mechanisms and Translational Implications. *Trends in molecular medicine*, 23, 899-916.
- FONTANA, L., COLMAN, R. J., HOLLOSZY, J. O. & WEINDRUCH, R. 2011. Calorie Restriction in Nonhuman and Human Primates. In: MASORO, E. J. & AUSTAD, S. N. (eds.) *Handbook of the Biology of Aging (Seventh Edition)*. San Diego: Academic Press.
- FONTANA, L. & PARTRIDGE, L. 2015. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*, 161, 106-118.
- GAO, X., SANDERSON, S. M., DAI, Z., REID, M. A., COOPER, D. E., LU, M., RICHIE, J. P., JR., CICCARELLA, A., CALCAGNOTTO, A., MIKHAEL, P. G., MENTCH, S. J., LIU, J., ABLES, G., KIRSCH, D. G., HSU, D. S., NICHENAMETLA, S. N. & LOCASALE, J. W. 2019. Dietary methionine links nutrition and metabolism to the efficacy of cancer therapies. *Nature*, 572, 397-401.
- GATENBY, R. A. & GILLIES, R. J. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4, 891-899.
- GEORGIU, C. D., GRINTZALIS, K., ZERVOUDAKIS, G. & PAPAPOSTOULOU, I. 2008. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 391-403.
- GIL, J., RAMÍREZ-TORRES, A. & ENCARNACIÓN-GUEVARA, S. 2017. Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective. *J Proteomics*, 150, 297-309.

- GILLESPIE, Z. E., PICKERING, J. & ESKIW, C. H. 2016. Better Living through Chemistry: Caloric Restriction (CR) and CR Mimetics Alter Genome Function to Promote Increased Health and Lifespan. *Frontiers in genetics*, 7, 142-142.
- GILLIES, R. J., DIDIER, N. & DENTON, M. 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*, 159, 109-113.
- GILLISON, M. L., CHATURVEDI, A. K., ANDERSON, W. F. & FAKHRY, C. 2015. Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33, 3235-3242.
- GOMEZ, A., GOMEZ, J., LOPEZ TORRES, M., NAUDI, A., MOTA-MARTORELL, N., PAMPLONA, R. & BARJA, G. 2015. Cysteine dietary supplementation reverses the decrease in mitochondrial ROS production at complex I induced by methionine restriction. *J Bioenerg Biomembr*, 47, 199-208.
- GRANDIS, J. R. & TWEARDY, D. J. 1993. Elevated Levels of Transforming Growth Factor α and Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Are Early Markers of Carcinogenesis in Head and Neck Cancer. *Cancer Research*, 53, 3579.
- GRINTZALIS, K., GEORGIU, C. D. & SCHNEIDER, Y.-J. 2015. An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination. *Analytical Biochemistry*, 480, 28-30.
- GU, X., OROZCO, J. M., SAXTON, R. A., CONDON, K. J., LIU, G. Y., KRAWCZYK, P. A., SCARIA, S. M., HARPER, J. W., GYGI, S. P. & SABATINI, D. M. 2017. SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 358, 813-818.
- GUO, H., TAN, Y., KUBOTA, T., MOOSSA, A. R. & HOFFMAN, R. M. 1996. Methionine depletion modulates the antitumor and antimetastatic efficacy of ethionine. *Anticancer research*, 16, 2719-2723.
- HAYANO, M., YANG, J.-H., BONKOWSKI, M. S., AMORIM, J. A., ROSS, J. M., COPPOTELLI, G., GRIFFIN, P. T., CHEW, Y. C., GUO, W., YANG, X., VERA, D. L., SALFATI, E. L., DAS, A., THAKUR, S., KANE, A. E., MITCHELL, S. J., MOHRI, Y., NISHIMURA, E. K., SCHAEVITZ, L., GARG, N., BALTA, A.-M., REGO, M. A., GREGORY-KSANDER, M., JAKOBS, T. C., ZHONG, L., WAKIMOTO, H., MOSTOSLAVSKY, R., WAGERS, A. J., TSUBOTA, K., BONASERA, S. J., PALMEIRA, C. M., SEIDMAN, J. G., SEIDMAN, C. E., WOLF, N. S., KREILING, J. A., SEDIVY, J. M., MURPHY, G. F., OBERDOERFFER, P., KSANDER, B. R., RAJMAN, L. A. & SINCLAIR, D. A. 2019. DNA Break-Induced Epigenetic Drift as a Cause of Mammalian Aging. *bioRxiv*, 808659.
- HELLMICH, M. R., COLETTA, C., CHAO, C. & SZABO, C. 2015. The therapeutic potential of cystathionine β -synthetase/hydrogen sulfide inhibition in cancer. *Antioxidants & redox signaling*, 22, 424-448.
- HENS, J. R., SINHA, I., PERODIN, F., COOPER, T., SINHA, R., PLUMMER, J., PERRONE, C. E. & ORENTREICH, D. 2016. Methionine-restricted diet inhibits growth of MCF10AT1-derived mammary tumors by increasing cell cycle inhibitors in athymic nude mice. *BMC cancer*, 16, 349-349.
- HENSLEY, C. T., WASTI, A. T. & DEBERARDINIS, R. J. 2013. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest*, 123, 3678-84.

- HICKEY, C. M., WILSON, N. R. & HOCHSTRASSER, M. 2012. Function and regulation of SUMO proteases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13, 755-766.
- HOCHSTRASSER, M. 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 458, 422-429.
- HOLM, E. 2007. *Stoffwechsel und Ernährung bei Tumorkrankheiten: Analysen und Empfehlungen*, Thieme.
- HOSIOS, A. M., HECHT, V. C., DANAI, L. V., JOHNSON, M. O., RATHMELL, J. C., STEINHAUSER, M. L., MANALIS, S. R. & VANDER HEIDEN, M. G. 2016. Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Developmental cell*, 36, 540-549.
- HUNT, J. L., BARNES, L., LEWIS, J. S., MAHFOUZ, M. E., SLOOTWEG, P. J., THOMPSON, L. D. R., CARDESA, A., DEVANEY, K. O., GNEPP, D. R., WESTRA, W. H., RODRIGO, J. P., WOOLGAR, J. A., RINALDO, A., TRIANTAFYLLOU, A., TAKES, R. P. & FERLITO, A. 2014. Molecular diagnostic alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck and potential diagnostic applications. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 271, 211-223.
- HUNTER, K. D., PARKINSON, K. E. & HARRISON, P. R. 2005. Profiling early head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5, 127-135.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B. & GUAN, K.-L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*, 13, 132-141.
- KOMNINOU, D., LEUTZINGER, Y., REDDY, B. S. & RICHIE JR, J. P. 2006. Methionine Restriction Inhibits Colon Carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, 54, 202-208.
- LAGE, H. 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci*, 65, 3145-67.
- LEVINE, M. E., SUAREZ, J. A., BRANDHORST, S., BALASUBRAMANIAN, P., CHENG, C.-W., MADIA, F., FONTANA, L., MIRISOLA, M. G., GUEVARA-AGUIRRE, J., WAN, J., PASSARINO, G., KENNEDY, B. K., WEI, M., COHEN, P., CRIMMINS, E. M. & LONGO, V. D. 2014. Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. *Cell metabolism*, 19, 407-417.
- LI, Y., LI, F., JIANG, F., LV, X., ZHANG, R., LU, A. & ZHANG, G. 2016. A Mini-Review for Cancer Immunotherapy: Molecular Understanding of PD-1/PD-L1 Pathway & Translational Blockade of Immune Checkpoints. *International journal of molecular sciences*, 17, 1151.
- LIBERTI, M. V. & LOCASALE, J. W. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences*, 41, 211-218.
- LIEU, E. L., NGUYEN, T., RHYNE, S. & KIM, J. 2020. Amino acids in cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 52, 15-30.
- LIM, Y. C., KOO, B. S., LEE, J. S., LIM, J.-Y. & CHOI, E. C. 2006. Distributions of Cervical Lymph Node Metastases in Oropharyngeal Carcinoma: Therapeutic Implications for the NO Neck. *The Laryngoscope*, 116, 1148-1152.

- LIU, M., CAO, H., HOU, Y., SUN, G., LI, D. & WANG, W. 2018. Liver Plays a Major Role in FGF-21 Mediated Glucose Homeostasis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45, 1423-1433.
- LONGO, VALTER D. & MATTSON, MARK P. 2014. Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Cell Metabolism*, 19, 181-192.
- MADEO, F., CARMONA-GUTIERREZ, D., HOFER, S. J. & KROEMER, G. 2019. Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell Metabolism*, 29, 592-610.
- MADEO, F., EISENBERG, T., PIETROCOLA, F. & KROEMER, G. 2018. Spermidine in health and disease. *Science*, 359, eaan2788.
- MADEO, F., ZIMMERMANN, A., MAIURI, M. C. & KROEMER, G. 2015. Essential role for autophagy in life span extension. *The Journal of clinical investigation*, 125, 85-93.
- MARTIN-MONTALVO, A., MERCKEN, E. M., MITCHELL, S. J., PALACIOS, H. H., MOTE, P. L., SCHEIBYE-KNUDSEN, M., GOMES, A. P., WARD, T. M., MINOR, R. K., BLOUIN, M.-J., SCHWAB, M., POLLAK, M., ZHANG, Y., YU, Y., BECKER, K. G., BOHR, V. A., INGRAM, D. K., SINCLAIR, D. A., WOLF, N. S., SPINDLER, S. R., BERNIER, M. & DE CABO, R. 2013. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nature communications*, 4, 2192-2192.
- MATTISON, J. A., ROTH, G. S., BEASLEY, T. M., TILMONT, E. M., HANDY, A. M., HERBERT, R. L., LONGO, D. L., ALLISON, D. B., YOUNG, J. E., BRYANT, M., BARNARD, D., WARD, W. F., QI, W., INGRAM, D. K. & DE CABO, R. 2012. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*, 489, 318-321.
- MERRIFIELD, R. B. 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85, 2149-2154.
- MONCADA, S. & HIGGS, A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 329, 2002-12.
- MORRIS, S. M., JR. 2016. Arginine Metabolism Revisited. *J Nutr*, 146, 2579s-2586s.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- NAYLOR, S. L., BUSBY, L. L. & KLEBE, R. J. 1976. Biochemical selection systems for mammalian cells: The essential amino acids. *Somatic Cell Genetics*, 2, 93-111.
- NGO, J. T. & TIRRELL, D. A. 2011. Noncanonical Amino Acids in the Interrogation of Cellular Protein Synthesis. *Accounts of Chemical Research*, 44, 677-685.
- OLD, I. G., PHILLIPS, S. E. V., STOCKLEY, P. G. & SAINT GIRONS, I. 1991. Regulation of methionine biosynthesis in the enterobacteriaceae. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 56, 145-185.
- ORBACH, S. M., EHRICH, M. F. & RAJAGOPALAN, P. 2018. High-throughput toxicity testing of chemicals and mixtures in organotypic multi-cellular cultures of primary human hepatic cells. *Toxicol In Vitro*, 51, 83-94.

- PAVIA, M., PILEGGI, C., NOBILE, C. G. & ANGELILLO, I. F. 2006. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1126-1134.
- PERRONE, C. E., MATTOCKS, D. A., PLUMMER, J. D., CHITTUR, S. V., MOHNEY, R., VIGNOLA, K., ORENTREICH, D. S. & ORENTREICH, N. 2012. Genomic and metabolic responses to methionine-restricted and methionine-restricted, cysteine-supplemented diets in Fischer 344 rat inguinal adipose tissue, liver and quadriceps muscle. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, 5, 132-57.
- RAGIN, C. C. R., MODUGNO, F. & GOLLIN, S. M. 2007. The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus. *Journal of Dental Research*, 86, 104–114.
- RAJMAN, L., CHWALEK, K. & SINCLAIR, D. A. 2018. Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell metabolism*, 27, 529-547.
- RIEDE, U.-N. & WEYER, N. 2017. Mundhöhle. In: RIEDE, U.-N. & WERNER, M. (eds.) *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. 2. ed. Berlin Springer-Verlag.
- RÖHM, K.-H. 2014. Prinzipien von Aminosäurestoffwechsel und Stickstoffumsatz. In: HEINRICH, P. C., MÜLLER, M. & GRAEVE, L. (eds.) *Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie*. 9. ed. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
- RUBINSZTEIN, DAVID C., MARIÑO, G. & KROEMER, G. 2011. Autophagy and Aging. *Cell*, 146, 682-695.
- RUCKENSTUHL, C., NETZBERGER, C., ENTFELLNER, I., CARMONA-GUTIERREZ, D., KICKENWEIZ, T., STEKOVIC, S., GLEIXNER, C., SCHMID, C., KLUG, L., SORGO, A. G., EISENBERG, T., BÜTTNER, S., MARIÑO, G., KOZIEL, R., JANSEN-DÜRR, P., FRÖHLICH, K. U., KROEMER, G. & MADEO, F. 2014. Lifespan extension by methionine restriction requires autophagy-dependent vacuolar acidification. *PLoS Genet*, 10, e1004347.
- SASAMURA, T., MATSUDA, A. & KOKUBA, Y. 1998. Tumor Growth Inhibition and Nutritional Effect of D-Amino Acid Solution in AH109A Hepatoma-Bearing Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 44, 79-87.
- SAXTON, R. A. & SABATINI, D. M. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168, 960-976.
- SCHEURER, M. J. J., BRANDS, R. C., EL-MESERY, M., HARTMANN, S., MÜLLER-RICHTER, U. D. A., KÜBLER, A. C. & SEHER, A. 2019. The Selection of NFκB Inhibitors to Block Inflammation and Induce Sensitisation to FasL-Induced Apoptosis in HNSCC Cell Lines Is Critical for Their Use as a Prospective Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 20, 1306.
- SCHNEIDER, T., STREHL, A., LINZ, C., BRANDS, R., HARTMANN, S., BECKFORD, F., ROSENWALD, A., KÜBLER, A. C. & MÜLLER-RICHTER, U. D. A. 2016. Phosphorylated epidermal growth factor receptor expression and KRAS mutation status in salivary gland carcinomas. *Clinical Oral Investigations*, 20, 541-551.
- SCHULTE, M. L., FU, A., ZHAO, P., LI, J., GENG, L., SMITH, S. T., KONDO, J., COFFEY, R. J., JOHNSON, M. O., RATHMELL, J. C., SHARICK, J. T., SKALA, M. C., SMITH, J. A., BERLIN, J., WASHINGTON, M. K., NICKELS, M. L. & MANNING, H. C. 2018.

- Pharmacological blockade of ASCT2-dependent glutamine transport leads to antitumor efficacy in preclinical models. *Nat Med*, 24, 194-202.
- SEČKUTĚ, J., MCCLOSKEY, D. E., THOMAS, H. J., SECRIST, J. A., 3RD, PEGG, A. E. & EALICK, S. E. 2011. Binding and inhibition of human spermidine synthase by decarboxylated S-adenosylhomocysteine. *Protein Sci*, 20, 1836-44.
- SGONC, R. & GRUBER, J. 1998. Apoptosis detection: an overview. *Experimental Gerontology*, 33, 525-533.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. & JEMAL, A. 2020. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, n/a.
- SINCLAIR, D. A. & GUARENTE, L. 1997. Extrachromosomal rDNA Circles - A Cause of Aging in Yeast. *Cell*, 91, 1033-1042.
- SINCLAIR, D. A. & MATTHEW, L. 2019. *Das Ende des Alterns - Die revolutionäre Medizin von morgen* Köln, DuMont-Verlag.
- SINCLAIR, D. A., MILLS, K. & GUARENTE, L. 1997. Accelerated Aging and Nucleolar Fragmentation in Yeast *sgs1* Mutants. *Science*, 277, 1313-1316.
- STEPANENKO, A. A. & DMITRENKO, V. V. 2015. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 574, 193-203.
- SUGIMURA, T., BIRNBAUM, S. M., WINITZ, M. & GREENSTEIN, J. P. 1959. Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. VIII. The forced feeding of diets each lacking in one essential amino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 81, 448-455.
- SZABO, C. & PAPAPETROPOULOS, A. 2017. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H(2)S Levels: H(2)S Donors and H(2)S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacological reviews*, 69, 497-564.
- TAN, Y., SUN, X., XU, M., TAN, X., SASSON, A., RASHIDI, B., HAN, Q., TAN, X., WANG, X., AN, Z., SUN, F.-X. & HOFFMAN, R. M. 1999. Efficacy of Recombinant Methioninase in Combination with Cisplatin on Human Colon Tumors in Nude Mice. *Clinical Cancer Research*, 5, 2157.
- TANNER, JASON M. & RUTTER, J. 2016. You Are What You Eat... or Are You? *Developmental Cell*, 36, 483-485.
- VAN DER WAAL, I. 2009. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*, 45, 317-323.
- VAN ENGELAND, M., NIELAND, L. J., RAMAEKERS, F. C., SCHUTTE, B. & REUTELINGSPERGER, C. P. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31, 1-9.
- VETTORE, L., WESTBROOK, R. L. & TENNANT, D. A. 2020. New aspects of amino acid metabolism in cancer. *British Journal of Cancer*, 122, 150-156.
- WALLIMANN, T., TOKARSKA-SCHLATTNER, M. & SCHLATTNER, U. 2011. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*, 40, 1271-96.

- WANDERS, D., HOBSON, K. & JI, X. 2020. Methionine Restriction and Cancer Biology. *Nutrients*, 12, 684.
- WARBURG, O., POSENER, K. & NEGELEIN, E. 1924. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem Z* 319–344.
- WARNAKULASURIYA, S. 2009. Causes of oral cancer – an appraisal of controversies. *British Dental Journal*, 207, 471-475.
- WEICHHART, T. 2018. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence. *Gerontology*, 64, 127-134.
- WILD, C. P., WEIDERPASS, E. & STEWART, B. W. 2020. *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*, Lyon, France, International Agency for Research on Cancer.
- ZHANG, Y., MORAR, M. & EALICK, S. E. 2008. Structural biology of the purine biosynthetic pathway. *Cell Mol Life Sci*, 65, 3699-724.
- ZHOU, Y., REN, J., SONG, T., PENG, J. & WEI, H. 2016. Methionine Regulates mTORC1 via the T1R1/T1R3-PLC β -Ca(2+)-ERK1/2 Signal Transduction Process in C2C12 Cells. *International journal of molecular sciences*, 17, 1684.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Energiebedarf von Körper- und Tumorzellen im Vergleich (eigene Darstellung).....	7
Abb. 2. Einfluss der Kalorien-Restriktion auf eukaryotischen Zellen und Organismen (modifiziert nach Escobar et al., 2019).....	9
Abb. 3. Stoffwechselprozesse des High- und Low-Energy-Metabolismus im Vergleich.....	10
Abb. 4. Überblick über Kalorien-Restriktion regulierte molekulare Mechanismen (modifiziert nach Gillespie et al., 2016).....	16
Abb. 5. Versuchsaufbau Methionin-/Cystein-Restriktion.....	31
Abb. 6. Versuchsaufbau Aminosäure-Analoga.....	33
Abb. 7. A-F Proliferationsverhalten der Zelllinien HaCaT, HeLa, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 nach Methionin-Restriktion.	46
Abb. 8. Übersicht des Methionin-/Cystein-Stoffwechsels.	47
Abb. 9. A-F Proliferationsverhalten der Zelllinien HaCaT, HeLa, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 nach Methionin-/Cystein-Restriktion.	48
Abb. 10. Mikroskopische Analyse der Zellen unter Methionin-Restriktion (40x Vergrößerung).	51
Abb. 11. A-G ZytoTox unter Methionin-Restriktion und konfluenten Bedingungen der Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25, HaCaT, L929 und HeLa.	53
Abb. 12. A-G WST1-Assay nach Methionin-Restriktion der Zelllinie FaDu, Detroit562, SCC9, SCC25, HeLa, HaCaT und L929.....	55
Abb. 13. A und B Übersicht des Proliferationsverhalten der Zelllinien FaDu, Detroit562, SCC9, SCC25, HeLa, HaCaT und L929 unter Methionin-Restriktion.	58
Abb. 14. Proliferationsverhalten der murinen Zelllinie L929 nach Methionin-/Cystein-Restriktion.	60
Abb. 15. Bestimmung der Gesamtproteinmenge der murinen Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion über fünf Tage mittels modifiziertem Bradford-Assay.	61
Abb. 16. A und B Übersicht einzelner Stoffwechselgruppen der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen.	64
Abb. 17. Übersicht der zusammengefassten Metabolite in einzelnen Stoffwechselgruppen der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen.	66
Abb. 18. A und B Relative Mengen der proteinogenen Aminosäuren unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen in der Zelllinie L929.....	68
Abb. 19. Relative Mengen der nicht-proteinogenen Aminosäuren und Aminosäurenderivate unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen in der Zelllinie L929.	69
Abb. 20. Relative Mengen der „direkt Methionin/Cystein abhängige Metabolite“ unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen in der Zelllinie L929.	70

Abb. 21. Relative Mengen der „indirekt Methionin/Cystein abhängige Metabolite“ unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen in der Zelllinie L929.	72
Abb. 22. Relative Mengen der Energiewährungen unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen in der Zelllinie L929.	73
Abb. 23. Metabolischer Fingerabdruck der Zelllinie L929 nach 48 h Methionin-Restriktion.	75
Abb. 24. A-D Relative Mengen der proteinogenen Aminosäuren unter Methionin-Restriktion im Vergleich zwischen proliferativen (Serie I) und konfluenten (Serie II) Bedingungen in der Zelllinie L929...77	77
Abb. 25. A-D Übersicht einzelner Stoffwechselgruppen unter Methionin-Restriktion im Vergleich zwischen proliferativen (Serie I) und konfluenten (Serie II) Bedingungen in der Zelllinie L929.	79
Abb. 26. A und B Metabolischer Fußabdruck der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion im Vergleich zwischen proliferativen (Serie I) und konfluenten (Serie II) Bedingungen.	81
Abb. 27. A-D Strukturformeln der Aminosäure-Analoga.	86
Abb. 28. A-K ZytoTox nach Zugabe von Aminosäure-Analoga zu der murinen Zelllinie L929 unter proliferativen Bedingungen.....	88
Abb. 29. ZytoTox-Analyse der Inhibition der Proliferation durch F_{moc}-L-Methionin in L929.	89
Abb. 30. A-F ZytoTox 72 h nach Zugabe von L-γ-Azidohomoalanin zu den Zelllinien HeLa, HaCaT, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 unter proliferativen Bedingungen.....	91
Abb. 31. A-F ZytoTox 72 h nach Zugabe von F_{moc}-L-Methionin zu den Zelllinien HeLa, HaCaT, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 unter proliferativen Bedingungen.....	92
Abb. 32. A-G ZytoTox 72 h nach Zugabe von L-γ-Azidohomoalanin zu den Zelllinien L929, HaCaT, Hela, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 unter konfluenten Bedingungen.	94
Abb. 33. A-G ZytoTox 72 h nach Zugabe von F_{moc}-L-Methionin zu den Zelllinien L929, HaCaT, Hela, FaDu, Detroit562, SCC9 und SCC25 unter konfluenten Bedingungen.	95
Abb. 34. Arbeitsprogramm – schematische Übersicht.	97

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. verwendete Zelllinien	25
Tab. 2. verwendete Zellkulturmedien und Zusätze	26
Tab. 3. verwendete Reagenzien und Chemikalien	27
Tab. 4. verwendete Geräte	28
Tab. 5. verwendete Verbrauchsmaterialien	28
Tab. 6. verwendete Lösungen	28
Tab. 7. Übersicht der gängigen Splitverhältnisse der Zelllinien, abhängig von der individuellen Wachstumsgeschwindigkeit	29
Tab. 8. Angaben über Cystein-, Cystin- und Methionin-Konzentration der verwendeten Medien	32
Tab. 9. Übersicht in welchen Konzentrationen und welchen Chemikalien die Aminosäure-Analoga gelöst wurden.	33
Tab. 10. Überschuss der Analoga in Relation zur Methionin-Konzentration im Medium.	34
Tab. 11. Überschuss der Analoga in Relation zur jeweiligen Methionin-Konzentration im Medium.	34
Tab. 12. Übersicht aller in der Massenspektrometrie gemessene Metabolite.	39
Tab. 13. Massenspektrometrische Untersuchung – Serie 1 (proliferative Bedingungen).	40
Tab. 14. Massenspektrometrische Untersuchung – Serie 2 (konfluente Bedingungen).	40
Tab. 15. Übersicht der relativen Zellzahlen durch Cystein- /Methionin- und kombinierte Methionin-Cystein-Restriktion nach fünftägiger Stimulation	49
Tab. 16. Übersicht der Konzentration und Menge der verwendeten Analoga.	87

7 Appendix

7.1. Gesamtübersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion und proliferativen Bedingungen (Serie I)

Rel. Average Normalized Peak Area (Average VS2-VS5)		Media 1d-Met	Media 2d-Met	Media 3d-Met	Media 4d-Met	Media 5d-Met	Media 1d-Met	Media 2d-Met	Media 3d-Met	Media 4d-Met	Media 5d-Met
Amino Acids	Alanine	228	388	478	505	414	159	249	306	291	314
	Arginine	87	97	99	99	93	95	100	104	101	89
	Asparagine	108	113	114	112	97	114	122	129	130	126
	Aspartate	104	118	119	123	124	115	128	137	137	133
	Cysteine	145	129	120	114	98	150	137	131	128	121
	Glutamate	132	178	226	232	274	142	184	217	220	239
	Glutamine	83	67	38	27	21	105	99	94	95	93
	Glycine	136	209	292	338	494	149	223	273	274	309
	Proline	109	98	86	87	78	119	128	137	137	134
	Serine	74	41	20	24	28	81	68	64	76	78
	Methionine	86	71	46	41	17	69	38	22	18	14
	Histidine	111	113	99	100	92	126	139	150	156	151
	Isoleucine	79	68	50	44	20	90	89	93	98	101
	Leucine	87	77	50	43	18	106	104	112	126	128
	Lysine	74	70	57	55	47	84	84	78	77	64
Phenylalanine	98	87	58	56	34	120	134	150	163	175	
Threonine	81	79	68	71	54	93	101	111	117	117	
Tryptophan	84	72	49	44	26	107	115	126	132	143	
Tyrosine	82	77	66	63	52	99	105	112	114	125	
Valine	96	102	100	102	94	110	121	128	134	132	
Amino Acid Derivatives	Cystine	654	265	46	53	0					
	GSH	253	337	519	227	200	130	137	147	147	142
	GSSG										
	Homocysteine	101	116	127	130	126	109	120	130	137	147
	Homoserine	78	90	102	111	119	86	104	125	139	131
	S-Adenosylhomocysteine	83	49	22	18	17	60	51	39	51	37
	S-Adenosylmethionine	80	76	65	62	51	98	105	112	113	120
	Cystathionine	104	127	147	162	199	123	142	165	175	183
	Cysteamine	99	1442	7813	9363						
	Taurine	88	42	25	18	20	102	107	119	124	141
	CoA	129	151	161	171	176	150	162	178	184	179
	Acetylglucine	97	110	76	69	149					
	Choline	1534	2497	2740	3056	2884	1701	3194	3591	3179	3089
	Betaine	4109	6346	7198	7482	6486	4390	6847	6939	6219	6205
	Aminobutyrate	2690	4145	4569	5178	4765	3047	4378	4869	4670	4670
	GABA	76	85	95	109	127	105	132	218	233	297
	Hydroxybutyrate	102	110	91	109	104	139	148	160	159	175
	Hydroxyproline	126	167	213	216	253	138	180	212	218	222
	Phenylpyruvate	89	73	41	35	12	105	109	118	127	131
	Creatine	113	122	120	120	113	131	147	159	167	162
	Creatinine	101	79	28	24	11	119	104	89	110	115
	Carnitine										
	Spermidine	98	96	87	83	81	107	110	120	122	123
	3-Methyl-2-oxobutanoate	102	115	119	119	120	105	110	112	111	108
	3-Methyl-2-oxopentanoate										
4-Methyl-2-oxopentanoate	55	53	43	43	34	88	87	86	87	83	
5-Hydroxytryptophane	267	824	1360	1433	1663	256	605	859	779	883	
3-Hydroxykynurenine	503	320	364	294	239	250	231	184	151	137	
Kynurenine											
N-Formylkynurenine	73	80	86	86	80	87	92	94	91	105	
Quinolinic Acid	81	79	68	71	54	93	101	111	117	117	
Serotonin (5-HT)	112	143	204	228	365	127	149	176	183	200	
Urea Cycle	Carbamoylphosphate	53	83	115	125	167	57	74	91	89	96
	Citrulline	122	121	143	147	142	112	128	147	133	129
	ArgSucc	96	92	69	62	24	94	90	84	88	89
	Ornithine	99	111	126	127	129	106	114	118	116	119
	N-Acetylmithine	81	81	105	129	125	62	101	126	157	154
TCA Cycle	Citrate	174	295	558	637	1100	202	343	475	456	516
	Aconitate	773	1505	2930	3202	5354	795	1326	1826	1531	2128
	α-Ketoglutarate	143	132	136	148	168	121	123	130	134	153
	Succinate	106	124	135	143	154	115	132	141	149	144
	Fumarate	273	186	219	258	306	174	178	222	233	268
	Malate	114	130	143	151	164	120	132	140	144	143
Carbohydrate Metabolites	Hexosephosphate	937	678	724	739	760	450	410	365	314	307
	Fructose-1,6-bisphosphate	435	156	87	52	44	99	154	125	47	37
	Dihydroxyacetone phosphate	85	102	106	108	90	109	115	120	134	116
	3-Phosphoglycerate										
	Phosphoenolpyruvate										
	Pyruvate	829	629	280	211	659	1458	499	557	431	794
	Lactate	104	120	139	137	158	105	112	124	127	130
	6-Phosphogluconate	108	76	56	43	31	134	98	80	76	65
	Glucuronate	116	151	211	284	328	213	265	393	418	484
	Pentose-5-phosphate	507	703	950	1275	1443	446	596	813	1055	1379
	Erythrose-4-phosphate	520	885	1366	1545	2087	403	626	865	951	1037
Deoxyribose-phosphate	171	285	337	338	344	163	187	219	234	255	
Glucosamine	180	190	194	214	185	182	209	228	236	238	
Glucosamine-phosphate											
Glycerol-3-phosphate						3499	3389	2957	7622	9045	
N-Acetylneuraminic acid	1039	1894	2380	3691	4632	998	1140	1007	1214	2585	

Rel. Average Normalized Peak Area (Average VS2-VS5)		Cells 1d-Met	Cells 2d-Met	Cells 3d-Met	Cells 4d-Met	Cells 5d-Met	Cells 1d-Met	Cells 2d-Met	Cells 3d-Met	Cells 4d-Met	Cells 5d-Met
Amino Acids	Alanine	65	83	86	96	98	55	43	34	29	26
	Arginine	73	85	84	79	83	75	85	81	89	91
	Asparagine	73	89	78	85	91	67	39	30	36	32
	Aspartate	97	75	55	74	67	87	57	48	55	39
	Cysteine	74	78	83	87	96	78	60	69	81	76
	Glutamate	86	77	90	88	91	68	62	57	56	43
	Glutamine	45	66	77	88	95	56	53	69	80	77
	Glycine	81	87	78	88	93	81	64	49	49	41
	Proline	84	87	69	79	79	82	53	45	48	36
	Serine	61	57	75	92	85	54	41	40	52	50
	Methionine	76	95	88	91	97	15	19	20	19	20
	Histidine	69	93	78	89	90	74	65	49	58	51
	Isoleucine	76	96	78	82	77	81	77	66	77	73
	Leucine	63	89	78	85	82	75	73	61	72	63
	Lysine	60	67	75	70	69	63	76	85	92	96
Phenylalanine	67	90	82	90	90	74	72	58	67	60	
Threonine	75	87	83	89	93	68	62	51	60	59	
Tryptophan	61	93	73	83	83	69	65	51	59	52	
Tyrosine	76	92	79	81	81	82	84	74	83	85	
Valine	79	92	85	92	93	83	78	71	80	76	
Amino Acid Derivatives	Cystine	44	26	12	52	41	34	31	20	74	46
	GSH	54	91	25	64	51	45	52	67	59	50
	GSSG	16	27	33	62	100	20	17	18	17	11
	Homocysteine	61	79	74	82	100	58	29	20	30	27
	Homoserine	56	90	64	85	88	82	83	64	87	70
	S-Adenosylhomocysteine	58	95	64	80	72	69	76	54	67	61
	S-Adenosylmethionine	75	91	77	79	79	80	84	73	81	84
	Cystathionine	94	66	38	46	44	69	56	45	48	37
	Cysteamine	92	71	69	78	54	73	33	34	30	28
	Taurine	100	75	54	58	53	79	65	60	53	40
	CoA	83	90	73	80	73	88	81	73	83	75
	Acetylglucine	90	41	47	75	60	87	50	39	23	16
	Choline	71	84	83	98	85	72	72	62	66	62
	Betaine	60	86	67	83	60	59	54	35	41	36
	Aminobutyrate	42	75	70	92	70	52	51	37	45	41
	GABA	58	93	72	87	82	65	73	52	57	57
	Hydroxybutyrate	76	96	88	89	87	64	67	69	71	67
	Hydroxyproline	87	78	92	89	92	68	61	55	56	41
	Phenylpyruvate	75	88	79	88	85	76	72	56	59	51
	Creatine	51	67	66	98	94	64	64	51	52	40
	Creatinine	31	27	23	25	25	46	83	85	88	79
	Carnitine	68	89	56	82	67	62	50	33	53	20
	Spermidine	89	88	84	94	92	86	73	61	53	37
	3-Methyl-2-oxobutanoate	78	79	69	89	75	73	61	52	69	48
	3-Methyl-2-oxopentanoate	45	24	55	37	22	40	32	74	55	39
4-Methyl-2-oxopentanoate	42	38	50	58	85	42	45	64	61	71	
5-Hydroxytryptophane	100	79	69	76	71	89	64	53	46	52	
3-Hydroxykynurenine	64	56	34	35	24	92	46	43	46	43	
Kynurenine	56	53	22	31	15	90	42	34	49	28	
N-Formylkynurenine	64	96	83	80	69	53	45	49	48	54	
Quinolinic Acid	75	87	83	89	93	68	62	71	61	59	
Serotonin (5-HT)	56	90	78	66	59	66	76	71	68	68	
Urea Cycle	Carbamoylphosphate	42	68	61	84	59	54	38	15	27	25
	Citrulline	40	46	77	52	43	39	47	63	57	63
	ArgSucc	66	68	69	65	61	68	69	81	85	87
	Ornithine	63	87	63	68	79	69	61	50	65	58
	N-Acetylmithine	80	93	86	87	85	85	86	77		

Rel. Average Normalized Peak Area (Average V52-V55)

Class	Compound	Media 1d +Met	Media 2d +Met	Media 3d +Met	Media 4d +Met	Media 5d +Met	Media 1d -Met	Media 2d -Met	Media 3d -Met	Media 4d -Met	Media 5d -Met
Lipids	Acetoacetate	106	118	125	128	128	123	134	144	146	143
	Mevalonate	82	62	39	35	11	113	99	92	93	85
	Mevalonate-5-phosphate	108	125	147	163	186	99	111	133	163	173
	Geranylgeranyl-PP	82	62	39	35	11	113	99	92	93	85
	Malonate	181	324	668	603	938	161	241	249	243	219
	Carbamoylaspartate	231	220	200	200	184	241	232	221	211	196
	Dihydroorotate	2	3	14	0	1	2	3	5	1	7
	Orotate	231	220	200	200	184	241	232	221	211	196
	Uracil	2	3	14	0	1	2	3	5	1	7
	Uridin	231	220	200	200	184	241	232	221	211	196
Pyrimidines	UMP	231	220	200	200	184	241	232	221	211	196
	UDP	231	220	200	200	184	241	232	221	211	196
	UTP	51	37	61	54	86	45	38	77	54	44
	dUridine	44	85	27	34	13	53	66	47	58	63
	dUMP	60	32	14	29	13	11	11	16	21	19
	dUDP	112	134	161	177	198	137	161	182	197	189
	dUTP	98	102	97	100	82	115	126	130	136	136
	UDP-Glc	98	102	97	100	82	115	126	130	136	136
	UDP-Glucuronate	100	81	48	49	18	65	19	7	11	7
	Cytosin	4068	7356	4366	4530	1807	1433	933	493	1018	1018
	Cytidin	147	122	114	125	107	128	144	153	165	171
	CMP	147	122	114	125	107	128	144	153	165	171
	CDP	293	190	166	178	198	309	194	121	123	204
	dCTP	94	108	115	121	124	111	123	132	133	135
	Thymin	223	211	148	111	103	239	166	116	106	112
	Thymidine	223	211	148	111	103	239	166	116	106	112
	TMP	36	44	100	42	42	42	42	53	43	48
	ITP	36	44	100	42	42	42	42	53	43	48
	dThymidine	36	44	100	42	42	42	42	53	43	48
	dTMP	36	44	100	42	42	42	42	53	43	48
dUDP	1	8	109	0	0	4	3	11	0	5	
dITP	1	8	109	0	0	4	3	11	0	5	
Purines	Inosin	462	514	538	599	871	176	141	147	299	1776
	dinosin	244	429	583	451	540	166	362	402	519	754
	IMP	1827	1149	1443	1784	1574	989	817	846	1085	1440
	Adenin	1827	1149	1443	1784	1574	989	817	846	1085	1440
	Adenosin	55	40	20	41	30	65	26	19	36	36
	AMP	82	33	24	18	8	40	0	1	4	3
	ADP	82	33	24	18	8	40	0	1	4	3
	ATP	91	80	55	44	21	42	12	6	5	7
	cAMP	79	48	24	12	16	9	7	0	0	15
	dAMP	79	48	24	12	16	9	7	0	0	15
	dADP	79	51	41	54	50	80	41	50	49	48
	dATP	70	83	67	75	77	65	98	85	70	51
	Guanin	53	25	1	17	11	52	4	1	8	26
	Guanosin	76	55	47	27	13	58	44	46	12	5
	GMP	80	42	40	46	48	61	31	29	25	14
GDP	71	71	79	79	89	72	68	77	68	54	
GTP	67	72	73	73	79	64	67	82	75	72	
Hypoxanthin	73	56	67	73	84	70	54	66	55	38	
Xanthin	61	61	69	75	90	50	65	54	53	37	
Xanthosin	59	62	73	63	79	44	57	37	34	20	
Xanthurenic Acid	64	51	64	68	91	62	48	50	29	26	
XMP	39	73	45	29	59	30	28	28	17	9	
Co-Factors	Riboflavin	42	81	59	62	49	52	66	42	55	35
	FMN	42	81	59	62	49	52	66	42	55	35
	FMNH2	63	67	85	93	96	66	64	71	74	52
	FAD	66	44	68	63	66	66	56	58	71	44
	FADH2	66	44	68	63	66	66	56	58	71	44
	Nicotinamide	25	0	35	23	71	52	8	0	0	6
	Nicotinate	60	35	32	51	48	77	53	54	56	9
	NAD+	42	27	23	41	49	66	57	34	61	15
	NADH	82	50	63	78	79	85	74	70	64	29
	NADP+	38	44	31	68	76	55	43	20	78	24
	NADPH	72	74	76	84	93	71	84	70	71	58
	Dihydrofolate	78	72	70	68	68	71	84	75	73	70
	Tetrahydrofolate	95	75	51	53	45	77	65	58	46	27
	S-Methyl-THF	34	75	24	10	8	45	43	33	51	45
	Tetrahydrobiopterin	83	78	72	69	59	76	59	53	54	54
Thiamine (+)	4	3	2	1	0	7	54	88	90	84	
Thiamine phosphate (+)	42	5	13	2	0	0	41	25	0	50	
Pantothenate	61	81	76	97	91	46	36	34	39	36	
Pyridoxine	75	67	57	62	54	73	50	27	47	45	

Rel. Average Normalized Peak Area (Average V52-V55)

Class	Compound	Cells 1d +Met	Cells 2d +Met	Cells 3d +Met	Cells 4d +Met	Cells 5d +Met	Cells 1d -Met	Cells 2d -Met	Cells 3d -Met	Cells 4d -Met	Cells 5d -Met
Lipids	Acetoacetate	56	66	57	56	52	52	70	73	86	83
	Mevalonate	86	46	29	57	34	95	38	33	38	29
	Mevalonate-5-phosphate	72	78	77	75	73	73	74	74	66	61
	Geranylgeranyl-PP	24	55	64	80	87	39	11	42	58	49
	Malonate	24	21	36	49	7	4	26	4	26	2
	Carbamoylaspartate	86	46	29	57	34	95	38	33	38	29
	Dihydroorotate	88	74	53	77	65	86	86	65	68	41
	Orotate	58	23	7	18	9	62	7	6	9	26
	Uracil	85	66	50	68	46	86	68	47	60	37
	Uridin	95	93	91	85	86	85	86	86	85	80
Pyrimidines	UMP	95	93	91	85	86	85	86	86	85	80
	UDP	95	93	91	85	86	85	86	86	85	80
	UTP	51	37	61	54	86	45	38	77	54	44
	dUridine	44	85	27	34	13	53	66	47	58	63
	dUMP	60	32	14	29	13	11	11	16	21	19
	dUDP	76	99	83	87	87	81	92	80	93	86
	dUTP	98	102	97	100	82	115	126	130	136	136
	UDP-Glc	98	102	97	100	82	115	126	130	136	136
	UDP-Glucuronate	100	81	48	49	18	65	19	7	11	7
	Cytosin	4068	7356	4366	4530	1807	1433	933	493	1018	1018
	Cytidin	147	122	114	125	107	128	144	153	165	171
	CMP	147	122	114	125	107	128	144	153	165	171
	CDP	293	190	166	178	198	309	194	121	123	204
	dCTP	94	108	115	121	124	111	123	132	133	135
	Thymin	223	211	148	111	103	239	166	116	106	112
	Thymidine	223	211	148	111	103	239	166	116	106	112
	TMP	36	44	100	42	42	42	42	53	43	48
	ITP	36	44	100	42	42	42	42	53	43	48
	dThymidine	36	44	100	42	42	42	42	53	43	48
	dTMP	36	44	100	42	42	42	42	53	43	48
dUDP	1	8	109	0	0	4	3	11	0	5	
dITP	1	8	109	0	0	4	3	11	0	5	
Purines	Inosin	78	44	44	62	42	68	30	28	35	28
	dinosin	69	30	35	62	49	70	39	25	45	29
	IMP	65	52	48	72	52	78	59	61	72	48
	Adenin	46	55	50	72	60	57	85	79	86	57
	Adenosin	55	40	20	41	30	65	26	19	36	36
	AMP	82	33	24	18	8	40	0	1	4	3
	ADP	82	33	24	18	8	40	0	1	4	3
	ATP	91	80	55	44	21	42	12	6	5	7
	cAMP	79	48	24	12	16	9	7	0	0	15
	dAMP	79	48	24	12	16	9	7	0	0	15
	dADP	79	51	41	54	50	80	41	50	49	48
	dATP	70	83	67	75	77	65	98	85	70	51
	Guanin	53	25	1	17	11	52	4	1	8	26
	Guanosin	76	55	47	27	13	58	44	46	12	5
	GMP	80	42	40	46	48	61	31	29	25	14
GDP	71	71	79	79	89	72	68	77	68	54	
GTP	67	72	73	73	79	64	67	82	75	72	
Hypoxanthin	73	56	67	73	84	70	54	66	55	38	
Xanthin	61	61	69	75	90	50	65	54	53	37	
Xanthosin	59	62	73	63	79	44	57	37	34	20	
Xanthurenic Acid	64	51	64	68	91	62	48	50	29	26	
XMP	39	73	45	29	59	30	28	28	17	9	
Co-Factors	Riboflavin	42	81	59	62	49	52	66	42	55	35
	FMN	42	81	59	62	49	52	66	42	55	35
	FMNH2	63	67	85	93	96	66	64	71	74	52
	FAD	66	44	68	63	66	66	56	58	71	44
	FADH2	66	44	68	63	66	66	56	58	71	44
	Nicotinamide	25	0	35	23	71	52	8	0	0	6
	Nicotinate	60	35	32	51	48	77	53	54	56	9
	NAD+	42	27	23	41	49	66	57	34	61	15
	NADH	82	50	63	78	79	85	74	70	64	29
	NADP+	38	44	31	68	76	55	43	20	78	24
	NADPH	72	74	76	84	93	71	84	70	71	58
	Dihydrofolate	78	72	70	68	68	71	84	75	73	70
	Tetrahydrofolate	95	75	51	53	45	77	65	58	46	27
	S-Methyl-THF	34	75	24	10	8	45	43	33		

7.2. Gesamtübersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Zelllinie L929 unter Methionin-Restriktion und konfluenten Bedingungen (Serie II)

Rel. Average Normalized Peak Area (Average V51-V54)		Media 1d +Met	Media 2d +Met	Media 3d +Met	Media 4d +Met	Media 5d +Met	Media 1d -Met	Media 2d -Met	Media 3d -Met	Media 4d -Met	Media 5d -Met	
Amino Acids	Class	Compound										
		Alanine	35	57	46	29	23	37	50	58	69	79
		Arginine	34	63	67	67	61	79	87	90	89	87
		Asparagine	43	59	58	44	34	86	92	95	101	101
		Aspartate	31	37	39	39	36	39	44	48	51	46
		Cysteine	51	57	52	49	45	58	51	49	50	49
		Glutamate	34	50	61	68	74	41	52	60	67	64
		Glutamine	107	65	16	17	20	110	101	93	89	83
		Glycine	17	32	60	77	90	21	30	37	44	46
		Proline	31	31	26	20	17	37	41	40	43	40
		Serine	18	10	11	9	9	25	19	19	22	25
		Methionine	49	34	18	11	7	10	6	4	3	5
		Histidine	17	19	18	17	18	22	25	27	30	31
		Isoleucine	49	35	11	5	4	56	56	55	58	54
		Leucine	37	23	7	3	3	43	48	49	55	50
		Lysine	15	24	22	21	19	25	27	27	26	30
		Phenylalanine	28	19	12	8	9	31	38	41	46	45
		Threonine	16	18	18	14	12	22	24	26	29	30
		Tryptophan	225	139	78	44	30	90	135	139	155	137
	Tyrosine	57	45	40	37	34	61	68	76	83	84	
	Valine	46	45	42	43	44	51	57	62	68	68	
Amino Acid Derivatives	Cystine	8	4	6	3	3	22	7	4	4	4	
	GSH	11	12	12	13	14	7	7	7	8	8	
	GSSG	569	649	654	686	722	774	818	811	894	872	
	Homocysteine	56	59	66	76	77	67	94	109	125	121	
	Homoserine	4250	1897	1018	828	856	1796	2332	2051	2099	1107	
	S-Adenosylhomocysteine	58	46	41	38	35	62	71	80	88	88	
	S-Adosylmethionine	44	47	65	90	115	43	58	69	85	91	
	Cystathionine	317	1573	4045	6740	8279	105	468	1322	3234	5136	
	Cysteamine	30	7	6	6	7	34	35	46	65	101	
	Taurine	36	40	46	51	55	38	47	49	53	53	
	CoA	516	669	744	251	96	1578	1991	2156	2437	2529	
	Acetylglucine	877	1204	1165	530	294	2390	2549	2593	2898	2829	
	Choline	606	733	740	403	234	1295	1591	1541	1777	1855	
	Betaine	4389	2846	2586	2650	3016	643	1579	1753	2389	2497	
	Aminobutyrate	48	40	43	43	51	60	60	72	77	80	
	GABA	33	48	59	64	72	41	52	61	70	66	
	Hydroxybutyrate	16	10	3	1	1	21	24	26	29	28	
	Hydroxyproline	56	47	42	43	52	54	59	64	73	74	
	Phenylpyruvate	31	13	3	4	5	29	23	20	26	35	
	Creatine	60	89	83	76	88	47	52	28	34	32	
	Creatinine	20	19	19	21	24	57	79	89	91	99	
	Carnitine	60	89	83	76	88	47	52	28	34	32	
	Spermidine	90	90	91	95	95	92	89	68	65	49	
	3-Methyl-2-oxobutanoate	84	69	81	78	84	93	57	58	54	56	
	3-Methyl-2-oxopentanoate	28	30	43	20	33	24	53	67	55	55	
	4-Methyl-2-oxopentanoate	64	72	67	87	100	54	53	49	65	64	
	5-Hydroxytryptophane	97	88	94	92	80	79	58	47	53	62	
	3-Hydroxykynurenine	100	79	40	35	31	65	43	40	24	24	
	Kynurenine	95	79	32	25	22	74	44	30	30	12	
	N-Formylkynurenine	87	91	68	64	62	86	77	85	73	67	
	Quinolinic Acid	77	82	82	91	97	76	68	62	69	76	
	Serotonin (5-HT)	69	52	39	53	60	80	82	90	98	80	
	Carbamoylphosphate	79	71	65	71	86	67	31	41	36	49	
Citrulline	48	44	60	60	70	55	50	59	56	90		
ArgSucc	66	55	46	47	57	83	63	73	78	100		
Ornithine	89	68	61	78	84	80	50	47	48	56		
N-Acetylmethionine	78	93	84	67	75	88	85	72	82	76		
Citrate	75	63	56	52	63	78	43	42	43	59		
Aconitate	78	78	76	58	70	61	35	39	37	34		
α-Ketoglutarate	69	80	76	75	82	88	73	81	78	88		
Succinate	79	77	65	72	80	94	57	65	58	66		
Fumarate	62	75	58	63	66	94	53	67	55	69		
Malate	64	62	56	67	75	91	77	61	74	67		
Hexosephosphate	45	54	50	40	49	67	58	69	63	93		
Fructose-1,6-bisphosphate	17	38	37	44	60	33	32	47	42	88		
Dihydroxyacetone phosphate	30	37	27	42	63	42	33	62	83	95		
3-Phosphoglycerate	55	42	42	32	46	60	52	76	65	87		
Phosphoenolpyruvate	52	47	45	62	80	67	86	82	70	73		
Pyruvate	35	39	41	33	35	56	63	72	56	78		
Lactate	71	52	51	72	82	55	72	55	75	68		
6-Phosphogluconate	41	21	23	20	23	85	69	67	83	74		
Glucuronate	60	57	62	71	89	71	61	75	71	81		
Pentose-5-phosphate	33	29	24	24	28	59	80	92	88	59		
Erythrose-4-phosphate	53	44	51	54	72	69	69	83	78	93		
Deoxyribose-phosphate	82	56	59	55	75	97	66	84	75	78		
Glucosamine	53	32	34	38	53	98	67	51	57	45		
Glucosamine-phosphate	54	43	44	49	59	83	62	84	78	97		
Glycerol-3-phosphate	43	54	51	33	53	58	51	74	78	90		
N-Acetylneuraminic acid	40	41	37	32	44	52	39	44	53	100		

Rel. Average Normalized Peak Area (Average V52-V55)		Cells 1d -Met	Cells 2d -Met	Cells 3d -Met	Cells 4d -Met	Cells 5d -Met	Cells 1d -Met	Cells 2d -Met	Cells 3d -Met	Cells 4d -Met	Cells 5d -Met	
Amino Acids	Class	Compound										
		Alanine	81	76	89	91	91	64	49	46	49	43
		Arginine	59	85	87	82	93	81	76	81	80	95
		Asparagine	75	74	86	95	92	61	42	31	35	32
		Aspartate	78	85	59	61	54	88	52	32	36	35
		Cysteine	60	88	75	91	97	54	58	54	61	55
		Glutamate	84	81	85	89	97	76	64	60	56	48
		Glutamine	66	59	78	86	100	64	54	55	64	70
		Glycine	69	85	80	94	95	71	60	41	41	33
		Proline	91	86	85	90	91	77	62	50	50	46
		Serine	60	54	70	72	95	59	42	55	59	71
		Methionine	80	71	80	88	93	12	15	13	14	15
		Histidine	77	78	77	87	96	83	75	64	73	75
		Isoleucine	80	66	66	56	69	97	85	76	82	80
		Leucine	79	63	66	59	77	92	83	72	85	83
		Lysine	55	69	70	69	77	70	72	79	84	100
		Phenylalanine	80	70	73	73	86	86	86	66	78	77
		Threonine	77	82	82	91	97	76	68	62	69	76
		Tryptophan	81	70	72	69	85	85	85	61	74	70
	Tyrosine	75	61	59	59	64	88	91	75	92	85	
	Valine	78	75	83	91	100	86	78	69	80	77	
Amino Acid Derivatives	Cystine	46	38	36	77	82	44	30	55	66	64	
	GSH	66	53	45	58	54	79	55	57	79	67	
	GSSG	18	27	46	78	99	19	20	18	19	17	
	Homocysteine	45	50	71	88	96	39	20	18	22	28	
	Homoserine	55	48	52	59	77	94	80	65	79	73	
	S-Adenosylhomocysteine	33	39	48	52	64	68	73	48	75	65	
	S-Adosylmethionine	74	59	57	56	62	88	91	73	91	83	
	Cystathionine	73	70	61	73	63	82	89	70	90	64	
	Cysteamine	93	79	56	56	60	73	56	56	55	49	
	Taurine	89	70	56	60	58	99	85	66	82	60	
	CoA	70	64	67	79	87	79	89	85	94	82	
	Acetylglucine	77	51	43	28	21	94	71	44	52	36	
	Choline	64	61	63	56	73	75	60	72	78	80	
	Betaine	76	56	56	42	58	89	59	58	62	58	
	Aminobutyrate	80	63	68	49	67	86	60	59	59	61	
	GABA	59	52	51	47	66	84	86	71	71	84	
	Hydroxybutyrate	84	73	79	100	91	88	83	68	76	76	
	Hydroxyproline	83	79	84	89	97	74	62	59	55	47	
	Phenylpyruvate	73	66	61	58	74	96	81	70	76	76	
	Creatine	58	71	83	96	100	68	65	54	52	41	
	Creatinine	20	19	19	21	24	57	79	89	91	99	
	Carnitine	60	89	83	76	88	47	52	28	34	32	
	Spermidine	90	90	91	95	95	92	89	68	65	49	
	3-Methyl-2-oxobutanoate	84	69	81	78	84	93	57	58	54	56	
	3-Methyl-2-oxopentanoate	28	30	43	20	33	24	53	67	55	55	
	4-Methyl-2-oxopentanoate	64	72	67	87	100	54	53	49	65	64	
	5-Hydroxytryptophane	97	88	94	92	80	79	58	47	53	62	
	3-Hydroxykynurenine	100	79	40	35	31	65	43	40	24	24	
	Kynurenine	95	79	32	25	22	74	44	30	30	12	
	N-Formylkynurenine	87	91	68	64	62	86	77	85	73	67	
	Quinolinic Acid	77	82	82	91	97	76	68	62	69	76	
	Serotonin (5-HT)	69	52	39	53	60	80	82	90	98	80	
	Carbamoylphosphate	79	71	65	71	86	67	31	41	36	49	
Citrulline	48	44	60	60	70	55	50	59	56	90		
ArgSucc	66	55	46	47	57	83	63	73	78	100		
Ornithine	89	68	61	78	84	80	50	47	48	56		
N-Acetylmethionine	78	93	84	67	75	88	85	72	82			

Rel. Average Normalized Peak Area (Average V51-V54)

Class	Compound	Media 1d -Met	Media 2d -Met	Media 3d -Met	Media 4d -Met	Media 5d -Met	Media 1d -Met	Media 2d -Met	Media 3d -Met	Media 4d -Met	Media 5d -Met	
Lipids	Acetoacetate	74	85	99	110	108	93	106	117	140	137	
	Mevalonate	39	46	60	77	93	42	57	69	98	122	
	Mevalonate-5-phosphate	198	55	7	9	10	214	176	145	135	106	
	Geranylgeranyl-PP											
	Malonate											
Pyrimidines	Carbamoylaspartate	172	499	766	985	1208	227	326	342	308	225	
	Dihydroorotate	63	0	36	0	0						
	Orotate											
	Uracil											
	Uridin	2	0	0	1	1	0	0	1	2	3	
	UMP	80	73	75	83	93	83	74	77	85	96	
	UDP	0	0	0	0	0						
	UTP											
	dUridine	65	65	111	133	158	32	62	51	76	64	
	dUMP											
	dUDP	24	35	49	65	82	30	40	50	65	65	
	dUTP											
	UDP-Glc	66	71	63	58	48	81	88	92	100	87	
	UDP-Glucuronate	4	0	15	13	14	0	322	0	0	569	
	Cytosin											
	Cytidin											
	CMP	266	213	119	39	14	178	86	93	117	216	
	CDP	52	45	32	30	32	68	63	68	60	63	
	CTP											
	dCytidine											
	dCMP											
	dCDP	192	105	125	80	85	217	472	80	74	61	
	dCTP	76	84	87	85	87	65	83	78	79	81	
	Thymine	151	91	73	52	54	145	88	82	58	70	
	Thymidine											
TMP	724	55	117	149	317	599	106	195	91			
TDP												
TTP												
dThymidine	6	15	15	7	13	2	46	206	333	2503		
dTMP	2	1	2	2	2	1	1	2	3	3		
dTDP	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2		
dTTP	7	0	26	0	9							
Purines	Inosin	168	214	207	283	274	179	89	154	643	1640	
	dInosin	37	49	49	65	70	53	131	231	362	368	
	IMP	173	38	28	47	54	127	29	29	9	2090	
	Adenin	121	54	33	41	18	83	39	35	21	202	
	Adenosin	136	19	7	3	4	99	9	4	1	1294	
	AMP											
	ADP											
	ATP	29	14	0	7	4						
	cAMP											
	dAMP	1	2	0	1	0	0	0	0	0	6	
	dADP	51	32	0	0	3						
	dATP	26	3	2	21	5	41	22	95	242	917	
	Guanin											
	Guanosin	118	285	295	1851	493	388	462	422	456	425	
	GMP	165	191	256	305	344	388	462	422	456	425	
	GDP	1	1	1	2	2	1	4	11	20	26	
	GTP	1182	0	1	2	39	0	2	0	0	64	
	Hypoxanthin	7	8	6	10	9	2	11	35	73	79	
	Xanthin	37	43	53	66	83	43	53	68	99	118	
	Xanthosin	25	17	23	24	21	29	16	12	11	9	
	Xanthurenic Acid	3	9	45	176	380	3	6	17	40	57	
	XMP											
	Co-Factors	Riboflavine										
		FMN	0	9	0	0	0	4	36	0	0	0
		FMNH2										
FAD												
FADH2												
Nicotinamide												
Nicotinate												
NAD+												
NADH												
NADP+												
NADPH		55	49	37	26	17	50	52	52	52	47	
Dihydrofolate		65	67	69	73	76	69	89	122	169	243	
Tetrahydrofolate		22	26	30	35	37	28	32	35	39	37	
5-Methyl-THF		4055	3041	1360	582	270						
Tetrahydrobiopterin		80	72	80	91	98	597	551	504	476	482	
Thiamine (+)	0	0	0	0	0							
Thiamine phosphate (+)												
Pantothenate	57	70	72	65	61	33	60	58	58	34		
Pyridoxine												

Rel. Average Normalized Peak Area (Average V52-V55)

Class	Compound	Cells 1d -Met	Cells 2d -Met	Cells 3d -Met	Cells 4d -Met	Cells 5d -Met	Cells 1d -Met	Cells 2d -Met	Cells 3d -Met	Cells 4d -Met	Cells 5d -Met	
Lipids	Acetoacetate	39	27	27	24	32	66	59	52	81	89	
	Mevalonate	81	84	80	85	89	94	81	83	84	95	
	Mevalonate-5-phosphate	54	47	64	77	99	53	32	25	34	42	
	Geranylgeranyl-PP											
	Malonate	0	0	5	0	25	0	0	0	31	50	
Pyrimidines	Carbamoylaspartate	76	65	57	40	52	23	13	14	16	39	
	Dihydroorotate	58	49	41	31	32	99	68	57	44	33	
	Orotate	59	57	57	70	81	75	72	64	62	40	
	Uracil	49	42	39	28	26	91	61	55	48	37	
	Uridin	65	57	52	64	67	82	82	67	78	55	
	UMP	75	78	80	84	94	86	78	82	87	94	
	UDP											
	UTP	30	50	58	62	86	72	68	71	68	74	
	dUridine	32	19	9	8	11	79	50	23	68	32	
	dUMP											
	dUDP	51	57	53	51	69	89	80	68	77	83	
	dUTP											
	UDP-Glc	33	10	13	8	12	90	63	47	69	64	
	UDP-Glucuronate	97	69	27	26	23	42	18	14	14	18	
	Cytosin											
	Cytidin											
	CMP	79	48	53	46	71	81	54	65	70	81	
	CDP	38	54	70	66	93	49	39	31	38	52	
	CTP	53	13	25	0	0	13	25	0	25	0	
	dCytidine	12	8	35	51	56	0	9	0	0	0	
	dCMP											
	dCDP	69	60	51	78	71	64	57	69	76	53	
	dCTP	56	64	79	93	85	33	66	66	75	59	
	Thymine	43	36	42	48	76	74	75	68	85	91	
	Thymidine											
TMP	59	53	59	50	57	90	68	67	66	66		
TDP	74	71	93	50	47	71	43	48	25	16		
TTP	20	21	27	43	63	43	59	76	91	93		
dThymidine	66	75	74	70	72	72	53	52	52	44		
dTMP	52	58	72	83	78	53	56	35	25	12		
dTDP	52	58	72	82	77	53	55	34	24	11		
dTTP	47	39	46	22	51	91	37	40	29	47		
Purines	Inosin	65	63	55	52	54	74	77	62	69	82	
	dInosin	55	47	51	57	58	65	67	72	95	86	
	IMP	62	58	56	55	60	91	89	82	84	75	
	Adenin	62	60	47	57	54	74	77	71	85	71	
	Adenosin	40	47	49	30	44	87	65	64	56	67	
	AMP											
	ADP											
	ATP	100	68	28	35	37	20	6	8	13	19	
	cAMP											
	dAMP	35	31	54	45	18	13	27	5	3	2	
	dADP	56	55	52	41	44	98	78	73	65	70	
	dATP	58	64	54	76	83	73	76	62	61	39	
	Guanin											
	Guanosin	71	53	32	38	36	92	74	55	57	48	
	GMP	72	68	49	61	71	88	83	77	73	52	
	GDP	56	60	64	88	88	65	88	83	87	64	
	GTP	76	84	68	81	85	72	70	68	67	45	
	Hypoxanthin	60	53	55	79	91	71	80	87	80	60	
	Xanthin	52	60	57	78	80	63	90	75	67	47	
	Xanthosin	58	66	54	66	76	81	82	63	44	30	
	Xanthurenic Acid	77	77	78	92	93	69	53	48	46	34	
	XMP	69	70	39	56	45	50	45	23	26	18	
	Co-Factors	Riboflavine	56	38	37	36	72	70	50	70	50	45
		FMN										
		FMNH2	39	48	64	84	96	46	57	63	64	62
FAD												
FADH2		44	43	47	58	69	54	65	88	84	82	
Nicotinamide		41	22	45	14	50	7	15	0	8	30	
Nicotinate		53	43	59	37	41	95	86	52	39	25	
NAD+		70	25	38	22	32	86	89	52	33	16	
NADH		64	68	66	76	85	91	90	78	64	48	
NADP+		63	42	31	49	45	93	68	52	30	13	
NADPH		56	66	68	93	97	55	78	80	79	61	
Dihydrofolate		81	62	69	80	75	64	63	62	77	88	
Tetrahydrofolate		92	69	51	53	58	96	79	58	53	26	
5-Methyl-THF		52	72	72	16	19	86	58	54	77	73	
Tetrahydrobiopterin		61	54	59	85	81	55	68	75	94	89	
Thiamine (+)	3	0	0	0	0	14	44	51	73	89		
Thiamine phosphate (+)												
Pantothenate	76	79	72	90	88	58	45	48	54	62		
Pyridoxine	64	56	34	45	51	77	55	69	50	70		

8 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. Kübler, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg, für die Themenstellung sowie für die Bereitstellung des wissenschaftlichen Labors zur Durchführung der Experimente als auch für die Betreuung dieser Doktorarbeit, bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. A. Seher, dem Leiter des wissenschaftlichen Labors der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg. Danke für die intensive Betreuung, die guten Ideen und die Hilfestellung bei Problemen während der experimentellen Phase sowie für die kritische Diskussion und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. T. Müller für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Danke an Herrn Dr. W. Schmitz für die gute Zusammenarbeit und die massenspektrometrische Analyse am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Würzburg.

Zudem bedanke ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des wissenschaftlichen Labors der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg, die durch die angenehme Arbeitsatmosphäre und Ihre Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders möchte ich mich bei Frau M. Schleyer für die Unterstützung in der Zellkultur und die Einführung in den Laboralltag bedanken.

Großen Dank möchte ich auch meinen Eltern, meiner Familie und Freunden für die Unterstützung und Motivation aussprechen.

9 Curriculum Vitae

Name	Corinna Koderer
	01.06.1995 (geboren in Illertissen)
Schule	2001-2005 Sebastian Kneipp Volksschule Bad Grönenbach
	2005-2013 Gymnasium Marianum Buxheim
	Juni 2013 Allgemeine Hochschulreife
Studium	April 2014 Studium der Zahnheilkunde
	Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	März 2015 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
	Oktober 2016 Zahnärztliche Vorprüfung
	Juni 2019 Zahnärztliche Prüfung
	Approbation als Zahnärztin
	seit Juli 2020 Assistenz Zahnärztin in der Praxis Drs. Pfister in Immenstadt im Allgäu

10 Publikationen

Wissenschaftliche Publikation als Resultat dieser Arbeit:

Schmitz, W.; **Koderer, C.**; El-Mesery, M.; Gubik, S.; Sampers, R.; Straub, A.; Kübler, A.C.; Seher, A.

Metabolic Fingerprinting of Murine L929 Fibroblasts as a Cell-Based Tumour Suppressor Model System for Methionine Restriction. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3039. <https://doi.org/10.3390/ijms22063039>

In Arbeit befindliche Publikation:

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

Cysteine Restriction in Murine L929 Fibroblasts as an Alternative Strategy to Methionine Restriction in Cancer Therapy

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet.

Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurde mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

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

Meine Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erzielen, vorgelegt. Ich habe bis zum heutigen Tag keine akademische Grade erworben, noch versucht solche zu erwerben.

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

Kempton, den 05.09.2021

Corinna Koderer

