

Aus der Frauenklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Achim Wöckel

**Einfluss von D- β -Hydroxybutyrat auf Stoffwechsel
und Interaktion mit Chemo-/Strahlentherapie
bei triple negativen Mamma-Karzinom Zellen**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

Jana Winkler
aus Zeil am Main

Würzburg, Juni 2021



Referentin: Apl. Prof. Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer
Koreferent: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:
19.10.2023

Die Promovendin ist Ärztin

Ich widme diese Doktorarbeit meinem Vater

PD Dr. med. Wilko Reents,

der mir in akademischen Fragen von der Schulzeit angefangen, über mein Studium, bis in mein heutiges Berufsleben stets zur Seite stand und ohne den ich wahrscheinlich heute nicht dort stehen würde, wo ich mich heute befinde.

Vielen Dank für die jahrelange Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Triple negative Brustkrebszellen	1
1.2	Warbureffekt / Tumorstoffwechsel	2
1.3	Ketogene Diät	3
1.4	Stoffwechsel Ketonkörper	4
1.5	Hypoxische Bedingungen Tumorgewebe	5
1.6	Ketogene Diät in der Tumorthapie	6
2	Material und Methoden	8
2.1	Medien	8
2.1.1	Medium Zellkulturflaschen	8
2.1.2	Medium Zellkulturplatten	8
2.1.3	β -Hydroxybutyrat-Lösung	8
2.2	Weitere verwendete Materialien	9
2.3	Methoden der Zellkultur	9
2.3.1	Anzüchten und Gewinnen der verschiedenen Tumorzelllinien	9
2.3.2	Zellzählung und Aussaat definierter Zellmengen	10
2.3.3	Herstellung Zellpellets für RNA bzw. Proteinisolation	10
2.3.4	Bestimmung von Glukose, Laktat und Ketonkörpern	11
2.4	Methoden des Proliferations- und Vitalitätstest	11
2.4.1	Colony formation assay	11
2.4.2	Kristallviolett	13
2.4.3	Bromdesoxyuridin-Test	13
2.4.4	Colorimetrischer Zell-Vitalitäts-Test (WST-8)	15
2.5	Chemosensitivitätstest	15
2.6	Bestrahlungsversuche	18

Inhaltsverzeichnis

2.7	Methoden der Genexpressionsanalyse	19
2.7.1	RNA Isolation	19
2.7.1.1	RNA Isolation aus Zellpellets	19
2.7.1.2	RNA-Isolation aus 6 Well Zellkulturplatten	21
2.7.2	cDNA Herstellung	22
2.7.3	PCR	22
2.7.4	Darstellung der PCR-Produkte mittels Agarosegel	23
2.7.5	Westernblot	24
2.8	Auswertung und Statistik	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Wachstumsvergleich G5-Medium und 3OHB	29
3.2	Wachstumsvergleich mittels colony formation assay	31
3.3	Glukose, Laktat, 3OHB Bestimmung	33
3.4	Expression des SGLT1 und SGLT2 Rezeptors	36
3.5	Hypoxienachweis mit Hilfe von Carbonic Anhydrase IX (CA IX)	38
3.6	Chemosensitivitätstestung	39
3.7	Bestrahlungsversuche	46
4	Diskussion	53
5	Zusammenfassung	61
	Literatur	62

1 Einleitung

1.1 Triple negative Brustkrebszellen

Bei Brustkrebs handelt es sich weltweit um die häufigste neu diagnostizierte Tumorart bei Frauen. Auch in Deutschland erkrankt jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom (1). Nach dem Bronchialkarzinom ist dies die zweithäufigste Todesursache aufgrund einer Tumorerkrankung in dieser Gruppe (2).

Die meisten der betroffenen Frauen erkranken erst in fortgeschrittenem Lebensalter. Eine Ausnahme hiervon bildet allerdings das triple-negative Mammakarzinom (triple negative breast cancer; TNBC), welches sich durch besondere Aggressivität und schlechte Prognose auszeichnet (3–7) – und besonders jüngere Frauen betrifft. Triple negative Brustkrebszellen sind durch ihren Hormon- und Wachstumsrezeptorstatus definiert:

Sie sind negativ für die Rezeptoren von Progesteron, Östrogen und HER2 (human epidermal growth factor 2). Insgesamt stellen TNBC's ca. 12–17% der Neuerkrankungen dar (3).

Triple-negative Mammakarzinome wurden erstmals 2005 beschrieben (3). Es handelt sich hierbei also um verhältnismäßig neue Erkenntnisse über den molekularen Aufbau der Brustkrebszellen. Durch voranschreitende Forschung, insbesondere auch auf Basis neuer molekulargenetischer Untersuchungen, kann die Gruppe der TNBC heute aber inzwischen immer detaillierter charakterisiert werden. Hierbei stellte sich heraus, dass es sich bei dieser Tumor-Art um eine durchaus sehr heterogene Gruppe handelt, die wiederum aus diversen Untergruppen mit verschiedenen Genmutationen zusammengesetzt ist (8).

Die postoperative Standardtherapie war und ist nach wie vor die klassische Chemotherapie. Insbesondere bei TNBC zeigt diese allerdings nur mäßigen Erfolg (9). Unterstützende und prognoseverbessernde Therapien werden deshalb dringend gesucht. Einige Patienten versuchen ihren Krankheitsverlauf durch Umstellung ihrer

1 Einleitung

Ernährungsgewohnheiten positiv zu beeinflussen. Eine der bekanntesten Ansätze stellt hierbei die Einhaltung einer ketogenen Diät dar.

Grundlage dieser Diät ist die Reduktion von oder der vollständige Verzicht auf Kohlenhydrate – ein Umstand, der dem veränderten Stoffwechsel von Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen Rechnung tragen soll. Auf diesen veränderten Stoffwechsel soll im Folgendem näher eingegangen werden.

1.2 Warbureffekt / Tumorstoffwechsel

In den 1920er Jahren entdeckten Otto Warburg und Kollegen, dass die Zuckeraufnahme (Glukose) und die Milchsäurebildung (Laktat) in Tumoren übermäßig gesteigert ist (10,11). Diese vermehrte Glukoseaufnahme von Tumorzellen wird heute in der Diagnostik der FDG-PET Bildgebung verwendet (110).

Das zweite beschriebene Charakteristikum, die gesteigerte Milchsäurebildung, findet in Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen auch unter aeroben Bedingungen statt. In gutartigen Zellen kommt es nur unter anaeroben Bedingungen zur Bildung von Laktat. Bei ausreichender Sauerstoffzufuhr stoppt diese Reaktion (Pasteur-Effekt; Pasteur L., 1861). Die in Tumorzellen beobachtete besondere Art des Laktat-Stoffwechsels wird als aerobe Glykolyse bzw. Warburg-Effekt bezeichnet (10, 11).

Gesunde Körperzellen gewinnen ihre Energie unter Sauerstoffpräsenz mittels oxidativer Phosphorylierung (OxPhos). Dieser Prozess spielt sich in den Mitochondrien unter Sauerstoffverbrauch und ATP-Erzeugung ab, wobei als Substrate für die OxPhos das Säureanion Pyruvat (das Endprodukt des Glukoseabbaus in der Glykolyse), einige Aminosäuren, Fettsäuren und Ketonkörper zur Verfügung stehen. Alle diese Reaktanden werden in Acetyl-CoA umgewandelt und anschließend in den Mitochondrien unter Reaktion mit Sauerstoff in Wasser und CO₂ umgewandelt, wobei Energie in Form von ATP entsteht.

Steht den Zellen kein Sauerstoff zur Verfügung (Hypoxie) wird aus Pyruvat Laktat gebildet, da Milchsäuregärung die einzige Form der Energiegewinnung unter Sauerstoffmangel darstellt (12). Im Gegensatz hierzu wird in Tumorzellen trotz aerober Bedingungen Glukose bzw. Pyruvat in großem Maße zu Laktat verstoffwechselt. Es finden somit in der Tumorzelle auch unter normalen Sauerstoffkonzentrationen Stoffwechselforgänge statt, die in gesunden Körperzellen nur unter Hypoxie zu beobachten sind. Dieses Phänomen wurde in den 1920er Jahren von Otto Warburg

1 Einleitung

erstmalig beschrieben und wird nach dessen Entdecker „Warburg Effekt“ genannt.

Diese spezielle Form der Glykolyse erzeugt allerdings weniger Energie (ATP) pro Glukosemolekül als die oxidative Phosphorylierung (13). Tumorzellen benötigen infolgedessen größere Glukosemengen für ihre Proliferation, insbesondere auch um ihren hohen Baustoffbedarf zu decken. Aus diesem Grund sind in vielen Tumorzelllinien die Glukosetransporter, sogenannte GLUT, die naturgemäß eine hohe Affinität zu Glukose aufweisen, überexprimiert (14).

Generell wurde eine erhöhte Glukoseaufnahme bei einigen Tumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert (15, 16). Zentraler gedanklicher Ansatz des therapeutischen Einsatzes einer ketogenen Diät ist es deshalb - durch Restriktion der Zuckeraufnahme - Glukose als Energieträger weitgehend durch Fette und Proteine zu substituieren. Im Rahmen dieses Prozesses stellt der Körper sogenannte Ketonkörper zur Verfügung, um den Energiebedarf, vor allem des energiehungrigen zentralen Nervensystems zu decken. Dieses ist unter der üblichen kohlenhydratreichen Ernährung stark abhängig von der zugeführten Glukose. Während einer längeren Fastenperiode, oder eben einer solchen ketogenen Diät, können diese Ketonkörper einen Großteil des Energiebedarfs decken (17). Die Möglichkeit, Ketonkörper als Energiequelle zu nutzen, steht einigen Tumorzellen aufgrund fehlender enzymatischer Ausstattung nicht zur Verfügung (18- 21).

Glukosereduktion erscheint daher als vielversprechender Ansatz zur unterstützenden Tumorthherapie.

1.3 Ketogene Diät

Eine bekannte Ernährungsform, die sich durch eine starke Reduktion der Kohlenhydrataufnahme auszeichnet, ist die sogenannte ketogene Diät. Darunter versteht man eine Ernährung, die sich aus einem hohen Fett-, einem balanzierten Protein- und einem sehr geringen Kohlenhydratanteil zusammensetzt. Der Begriff ist allerdings nicht besonders trennscharf definiert. Trotz unterschiedlicher konkreter Varianten ist allen eine zielgerichtete Stoffwechsellage gemein, infolgedessen sich im peripheren Blut und im Urin Ketonkörper über dem Schwellenwert von 0,5 mM nachweisen lassen (22, 23). Neben der ursprünglich sehr strikten 4:1 ketogenen Diät (Verhältnis Fettanteil zu Anteil Proteinen und Kohlenhydrate in der Nahrung) und der modifizierten 3:1 ketogenen Diät existieren inzwischen viele andere Aus-

1 Einleitung

formungen. Exemplarisch zu nennen wäre hier die „modifizierte Atkins Diät“ und die „mittelkettige Fettsäuren basierte ketogene Diät“ (mid chain triglyceride, MCT) (24). Eine Übersicht über die heute häufig angewandten Formen findet sich auf der Website der Charlie Foundation (www.charlifoundation.org; 25).

Durch den hohen Fettanteil in der Nahrung bezieht der Körper den Großteil seiner benötigten Energie dann nicht mehr aus Glukose (mit anschließender Glykolyse), sondern aus der Verstoffwechslung der Fette. In der Leber werden Fette in Ketonkörper umgewandelt, die wiederum zu einer Ketose im Körper führen. Neben Aceton, Acetoacetat wird dabei vor allem D- β -Hydroxybutyrat (3-OHB) produziert, welches als Ketonkörper von zentraler Bedeutung ist.

Dieser Effekt kann generell auch durch temporären Nahrungsverzicht (Fasten) erreicht werden.

Ketonkörper lassen sich beim Menschen im Blut oder im Urin nachweisen (26, 22). Der normale Serumspiegel im Menschen liegt bei $<0,5\text{mM}$ (22). Er kann unter kurzzeitigem Fasten im Mittel aber auf bis zu 3.2 mM ansteigen (27). Bei längerfristigem Fasten können sogar Konzentrationen von bis zu 6mM erreicht werden (28,29). Unter einer ketogenen Diät werden üblicherweise wenigstens 2mM Plasmaspiegel erreicht (30). Für unsere Versuche wählten wir deshalb eine Konzentration von 3mM 3-OHB.

1.4 Stoffwechsel Ketonkörper

Als physiologische Ketonkörper bezeichnet man die drei Moleküle Acetacetat, Aceton und β -Hydroxybutyrat. Bei der Oxidation von Fettsäuren entsteht Acetyl-CoA, welches in Anwesenheit von Oxalacetat dem Citratzyklus zugeführt wird. Bei unzureichender Kohlenhydratzufuhr oder Hungerzustand wird Oxalacetat zur Glukoneogenese benötigt und steht somit nicht Acetyl-CoA zur Verfügung.

In diesem Fall akkumuliert Acetyl-CoA und wird in der Leber zu den oben genannten Ketonkörpern umgebaut (32, 33). Bei Diabetikern mit absolutem oder relativem Insulinmangel ist dieser Vorgang abnorm gesteigert, was zur Zuckerentgleisung und Ketoazidose führen kann (22). Die in der Leber erzeugten Ketonkörper gelangen über den Blutkreislauf in das periphere Gewebe und dienen dort als Brennstoff zur Energiegewinnung. In Hungerzuständen ist auch das Gehirn in der Lage, bis zu 80% der benötigten und üblicherweise aus Glukose gewonnenen Energie

1 Einleitung

aus Ketonkörpern zu bilden (22). Zur Umwandlung müssen extrahepatische Zellen 3-OHB wieder in Acetyl-CoA umwandeln, welches wiederum über den Citratzyklus verstoffwechselt und somit zur Energiegewinnung genutzt werden kann. Hierfür wandelt die β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (BDH₁) zunächst mitochondrial 3-OHB in Acetoacetat um. Dieses Stoffwechselintermediat erhält von Succinyl-CoA über die Succinyl-CoA:3-Ketoazid-Coenzym-A-Transferase (SCOT) das Coenzym A – hierdurch entsteht Acetoacetyl-CoA. Dieses wird im letzten Schritt durch die Acetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT 1/2) in Acetyl-CoA umgewandelt (32). Bei der Oxidation von 3-OHB kann pro mol Sauerstoff hierbei sogar mehr ATP im Vergleich zum Glukose-Stoffwechselprozess generiert werden, weswegen 3-OHB bisweilen als „superfuel“ bezeichnet wird (34). Um 3-OHB in Energie umzuwandeln, benötigen Tumorzellen funktionsfähige Mitochondrien und eine ausreichende Sauerstoffversorgung. Das O₂-Angebot in Tumor und gesundem Gewebe unterscheidet sich allerdings messbar.

1.5 Hypoxische Bedingungen Tumorgewebe

Die meisten Tumoren wachsen in hypoxischen Bedingungen – dies gilt ebenso für Brustkrebstumoren (35). Hypoxie bedeutet, dass es zu einem Ungleichgewicht mit unzureichender Sauerstoffversorgung im Verhältnis zum schnell wachsendem Tumorgewebe kommt. Zum Nachweis dienen die unter Hypoxie vermehrt exprimierten Faktoren Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1a (HIF-1a) und die Carbonic-Anhydrase IX (CAIX). Erhöhte HIF-1a Spiegel sind in vielen soliden Tumoren – Brustkrebstumoren eingeschlossen – mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (36). Die Expression von CAIX wird durch HIF-1a gesteuert und CAIX ist ein sogenanntes „Downstream“-Protein von HIF-1a. Das bedeutet, dass die Expression von CAIX auf HIF-1a induzierte Signalkaskaden zurückzuführen ist. CAIX dient zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH unter Hypoxie und senkt den extrazellulären pH (37). Erhöhte Spiegel von CAIX sind ebenfalls mit einer schlechteren Prognose in zahlreichen Tumoren assoziiert (38).

Um den realen physiologischen Bedingungen in den Experimenten näher zu kommen, wurden die Versuche nicht nur im näherungsweise durchschnittlichen 21% atmosphärischen Sauerstoffgehalt durchgeführt, sondern auch unter milder (5% O₂-Gehalt) und starker Hypoxie (1% O₂-Gehalt). Diese Bedingungen sind auch in vivo

im Tumor zu finden (39, 40, 41). Der Nachweis, dass sich die Tumorzellen unter Hypoxie befanden, wurde Mittels CAIX Bestimmung im Westernblot durchgeführt.

1.6 Ketogene Diät in der Tumorthherapie

Onkologische Patienten versuchen immer häufiger durch ketogene Diät ihren Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen.

Die Frage nach der therapeutischen Wirksamkeit ist allerdings offen und wird kontrovers diskutiert (42-51). Einige Studien zeigten im Mausmodell einen positiven Effekt der ketogenen Diät im Bezug auf das Tumorstadium (42, 43, 44). In Kombination mit Sauerstofftherapie oder Bestrahlung konnte diese Wirkung noch um ein Vielfaches verstärkt werden (45,46). Es existieren allerdings durchaus auch konträre Studien, die – ebenfalls im Mausmodell – keinen positiven Effekt dieses Therapieansatzes auf Tumorstadium und Letalität feststellen (47). Bei sehr hohen Ketonkörperspiegeln wurde gemeinhin sogar ein für das Metastasenwachstum fördernder Einfluss beobachtet (48, 49).

Klinische Studien zur Prüfung der Wirksamkeit sind momentan lediglich in Form einiger Fallstudien publiziert – meist mit an Hirntumoren erkrankten Patienten. Da es sich hierbei tendenziell um Einzelfallbeschreibungen handelt, lassen sich hiermit kaum belastbare Ergebnisse ableiten. Ein positiver Einfluss der ketogenen Diät auf die Tumorstadium scheint jedoch wahrscheinlich (50, 51). Neben Wirksamkeit ist auch Sicherheit und Realisierbarkeit einer solchen Therapie Teil aktueller Diskussion. Kritisiert wird besonders, dass der Verzicht auf Kohlenhydrate und die daraus folgende Gewichtsabnahme zur Schwächung von Tumorstadium führen könnte. Einige Studien zu diesem Thema zeigten jedoch, dass schwere Nebenwirkungen allgemein nicht zu beobachten sind und somit dieser Therapieansatz als „sicher“ eingestuft werden darf. Die ketogene Diät scheint ebenfalls die Lebensqualität nicht relevant negativ zu beeinflussen (52-56).

Aufgrund der dennoch widersprüchlichen Studienergebnisse und der Tatsache, dass diese Therapieform in der onkologischen Praxis an Bedeutung gewinnt, untersuchten wir in diesem Zusammenhang den Einfluss von 3-OHB auf die Zellproliferation von triple negativen Brustkrebszellen unter verschiedenen Bedingungen. Die Hypothese hierbei war, dass 3-OHB die Proliferation dieser Tumorzellen alleine, oder im Kontext mit klassischen Tumorstadium, wie Bestrahlung und Chemothera-

1 Einleitung

pie, beeinflusst. Das Ziel dieser Arbeit war es, durch verschiedene standardisierte Untersuchungen diesen Einfluss in Zellkulturen unter möglichst physiologischen Bedingungen zu ermitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Medien

2.1.1 Medium Zellkulturflaschen

Die Zellen wurden in den Zellkulturflaschen (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Hams F12, 500ml; Biochrom, Berlin, Deutschland; FG4815) angezüchtet. Dem Zellkultur-Medium wurden 50ml Fetales-Kälber-Serum (fetal calf serum; FCS Superior Biochrom) sowie 500 μ l Gentamicin (Konzentration 10mg/ml; Biochrom A2712; Endkonzentration 9,1 μ g/ml) zugefügt.

2.1.2 Medium Zellkulturplatten

Für die Experimente wurden die Zellen in den Zellkulturplatten in G5-Medium ausgesät. Dieses setzt sich zusammen aus 500ml DMEM-Medium (Gibco. ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) und 40%iger Glucoselösung, so dass eine 5mmolare Lösung entstand beziehungsweise das Medium eine physiologische Glucosekonzentration von 90mg/dl erreichte. Das Ergebnis wurde mit Hilfe von Blutzucker-teststreifen überprüft (Blutzuckermessgerät: Accu-Chek Sensor; Roche Teststreifen: Accu-Chek Sensor Comfort Pro; Roche, Basel, Schweiz). Weitere Zusätze waren 50ml FCS-Serum (Biochrom), sowie 500 μ l Gentamicin (siehe oben).

2.1.3 β -Hydroxybutyrat-Lösung

Für mehrere Versuche wurde eine drei-, beziehungsweise sechs-mmolare β -Hydroxybutyrat (3OHB)-Konzentration im Medium benötigt. Hierfür wurde zunächst eine 1molare Stock-Lösung hergestellt (Molekulargewichts des β -Hydroxybutyrats: 126,04 g/mol, Herstellung mittels 106mg Natrium-3-Hydroxybutyrat (Sigma) + 0,84ml G5-Medium). Nach Zugabe des G5-Mediums und Durchmischung der Lösung, wurde

diese steril filtriert und im Kühlschrank gelagert. Nach Bedarf wurde die angesetzte 1molare Stocklösung mit weiterem G5-Medium versetzt, so dass die gewünschte Endkonzentration entstand.

2.2 Weitere verwendete Materialien

Der verwendete Standardpuffer war Dulbecco's phosphat-buffered saline (PBS, Biochrom). Um die adhärenen Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurde Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verwendet. Die Trypsin Stocklösung von 10X (Konzentration) wurde hierzu mit PBS auf 1X verdünnt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Cellstar) angezüchtet und jeweils bei Konfluenz (Zellrasen geschlossen) gesplittet. Für die Versuche wurden Zellkulturplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz) mit unterschiedlicher Well-Anzahl verwendet. Die Zellkulturen wurden in verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen angezüchtet. Für 21% wurde ein CO₂-Inkubator (Labotect, Göttingen, Deutschland), für 5% beziehungsweise 1% Sauerstoffkonzentration wurden Hypoxie-Inkubatoren (Coy Laboratories Products Inc, Grass Lake, MI, USA) verwendet. Um unterschiedliche Lösungen zu pipettieren, wurden sterile 50ml-Röhrchen (Cellstar) verwendet. Für das Pipettieren selbst wurde, wenn nötig, RNase freie Spitzen (Biostar) verwendet. War dies nicht der Fall wurden normale Pipettenspitzen (Eppendorf) in verschiedenen Größen benutzt.

2.3 Methoden der Zellkultur

2.3.1 Anzüchten und Gewinnen der verschiedenen Tumorzelllinien

Für die Versuche wurden die Brustkrebs-Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 468 und BT-20 verwendet. Bei diesen handelt es sich um triple negative humane Brustkrebszellen. Alle Zelllinien wurden von Cell Lines Service (CLS GmbH, Eppelheim, Deutschland) gekauft. MDA-MB 231 wurde ursprünglich aus einer pleuralen Metastase isoliert, ebenso wie die Zelllinie MDA-MB 468. BT-20 stammt aus einem soliden Brusttumor. (1)

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche (T75; Cellstar) gegeben und diesen ca. 15ml Ham's F12 Medium zugefügt. Die Zellen wurden

2 Material und Methoden

bei 37°C und 21% Sauerstoffkonzentration im CO₂-Inkubator angezüchtet. In regelmäßigen Abständen wurde das Wachstum unter einem Lichtmikroskop kontrolliert sowie eine mögliche Kontamination durch Pilze überprüft. Waren die Zellkulturflaschen dicht bewachsen, oder wurden die Zellen für die Versuche benötigt, wurden diese abtrypsinisiert. Hierfür wurde das Medium der Zellkulturflaschen abgezogen und 10ml PBS in die Zellkulturflaschen gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken wurden die Zellkulturflaschen gespült und anschließend das PBS wieder abgezogen. Es wurde 1-2ml Trypsinlösung (Trypsin/EDTA Solution 0,05% Trypsin 0,02% EDTA) in die Flaschen gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Das Trypsin wurde ebenfalls wieder abgezogen und die Zellkulturflaschen zum Ablösen der Zellen für 3-5min in den CO₂-Inkubator verbracht. Die sich ablösenden Zellen wurden für die Versuche verwendet. Ein Teil der Zellen zur weiteren Vermehrung in neue Zellkulturflaschen gegeben.

2.3.2 Zellzählung und Aussaat definierter Zellmengen

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde für die jeweiligen Versuche eine definierte Anzahl von Zellen pro Well in die Zellkulturplatten benötigt. Hierfür wurden die Zellen zunächst abtrypsinisiert, in G₅ Medium aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Bevor die Zellen ausgezählt wurden, wurden 20µl der Zelllösung mit 20µl Trypanblau-Lösung (Roth) vermischt. Trypanblau kann die Zellmembran vitaler Zellen nicht durchdringen, so dass die vitalen Zellen als weiße Punkte gezählt werden können. Abgestorbenen Zellen hingegen besitzen diese Barrierefunktion nicht mehr, wodurch die Zelle blau angefärbt wird. Die Zählkammer besitzt außen vier größere Quadrante. In diesen wurde die Zellzahl pro Feld ausgezählt und der Mittelwert ermittelt. Dieser Wert wurde mit 2 (Verdünnungsfaktor), sowie mit 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu ermitteln. Je nach benötigter Zellmenge wurde wiederum eine definierte Menge der Lösung abgenommen und mit G₅ Medium auf das berechnete Volumen gebracht.

2.3.3 Herstellung Zellpellets für RNA bzw. Proteinisolation

Die Zelllinien wurden ca. eine Woche in G₅ Medium oder in 3mmolarem 3OHB-Medium in verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21%, 5%, 1%) angezüchtet. Hierbei wurde das Medium nach ca. 3-4 Tagen erneuert. Somit wurde für jede Zell-

2 Material und Methoden

linie (MDA-MB 231, MDA-MB 468, BT-20) für jede der drei Sauerstoffkonzentrationen sowohl eine Zellkulturflasche mit G₅ und eine mit 3OHB angelegt. Waren die Zellkulturflaschen nach einer Woche dicht bewachsen, wurden die Zellen abtrypsinisiert. Die Zellen wurden in 5ml G₅-Medium aufgenommen und diese in ein 15ml Röhrchen überführt. Die 5ml wurden mit 10ml PBS-Puffer auf 15ml aufgefüllt und 10min bei 4°C, 260 x g für 5min abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren grob entfernt. Verbleibende Reste wurden mittels Pipette abgenommen. Das unten verbliebene Zellpellet wurde anschließend durch mehrmaliges Aufziehen in einer Glaspipette in 3ml PBS-Puffer resuspendiert. Die 3ml wurden zu je 1ml auf 3 beschriftete Eppendorfgefäße aufgeteilt. Die Eppendorfgefäße wurden dann bei 4°C, 400 x g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle entfernt und das verbliebene Zellpellet bei -80°C weggefroren.

2.3.4 Bestimmung von Glukose, Laktat und Ketonkörpern

Zur Bestimmung des Glukose- und Laktatverbrauchs wurde eine Glukose- und Laktatmessung durch das Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg durchgeführt. Hierfür wurde der Überstand der Kontrollreihe der Zytostatikaversuche abgenommen und Wells gleicher Bedingungen gepoolt. Bei Proben, die β -Hydroxybutyrat enthielten, wurde die Konzentration der Ketonkörper durch ein „Freestyle-Precision β -Ketone“-Messgerät der Firma Abbott und den dazugehörigen β -Ketone-Teststrips ermittelt.

2.4 Methoden des Proliferations- und Vitalitätstest

2.4.1 Colony formation assay

Um das Zellwachstum unter normalem Medium und 3OHB visuell beurteilen zu können, wurde ein sogenannter Colony-forming Test angesetzt. Hierfür wurden von jeder Zellkultur wenige Zellen (s.u.) ausgesät, unter normalem Medium, oder Medium mit 3OHB angezchtet und nach entsprechender Zeit, wenn diese Kolonien ausgebildet hatten, das Ergebnis mittels Kristallviolett festgehalten (MDA-MB 231:5 Tage, MDA-MB 468:7 Tage, BT-20:10 Tage). Die Zellkulturen wurden hierzu am ersten Tag in 500 μ l G₅ Medium, oder in 500 μ l G₅ Medium versetzt mit 3OHB in

2 Material und Methoden

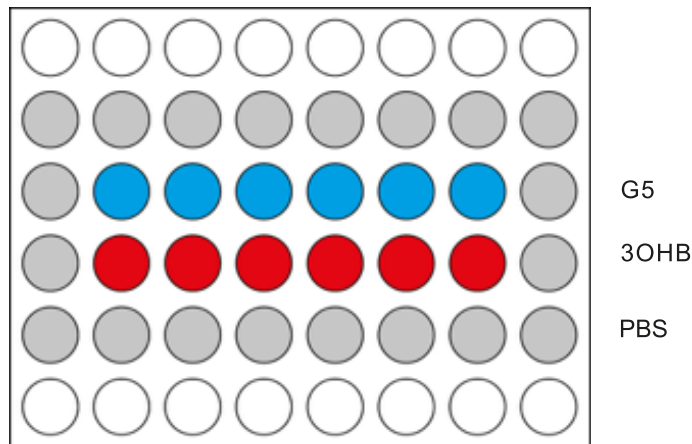


Abbildung 1: Plattenbelegung Colony formation assay

einer 48 Well Platte (TPP) ausgesät. Die Konzentration von 3OHB war 3molar. In der Mitte der Platte befanden sich jeweils sechs Well mit 3OHB und 6 Well als Kontrolle mit G5 Medium. Als Schutz vor Verdunstung wurden umrandete Wells mit je $500\mu\text{l}$ PBS-Puffer befüllt (siehe Abbildung 1; Plattenbelegung colony forming). Die schnell wachsende Zelllinie MDA-MB 231 wurde mit 150 Zellen pro Well ausgesät, die Zelllinie MDA-MB 468 mit 200 Zellen pro Well und die deutlich langsam wachsendere Zelllinie BT-20 mit 1000 Zellen pro Well. Dies hatte sich in Vorversuchen als die geeignetste Zellzahl erwiesen. Für jede Zelllinie wurden 3 Zellkulturplatten angelegt und diese nach 3-4 Stunden im CO_2 -Inkubator in verschiedene Sauerstoffkonzentrationen gebracht. Die Zellen wurden in Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5% und 1% angezüchtet und dabei regelmäßig nach ihrem Wachstum beurteilt. Falls erforderlich, wurde nach 5-7 Tagen das Medium der Zellen erneuert, wobei die Hälfte abgenommen wurde und gegen $250\mu\text{l}$ neues G5, beziehungsweise G5 mit 3mM 3OHB ausgetauscht wurde. Hatten sich entsprechende Kolonien ausgebildet, wurden diese mittels Kristallviolett-Färbung sichtbar gemacht (siehe Methoden Kristallviolett) und mittels ImmunoSpot Analyzer und dem entsprechenden Programm CTL Immuno Capture 6.2 (Cellular Technology, Shaker Heights, OH, USA) dokumentiert.

2.4.2 Kristallviolett

Zur Beurteilung der Zellmasse adhärenz gewachsener Zellen- bzw. Zellkolonien in den Zellkulturplatten, wurde der Kristallviolett-Test angewendet. Hierfür wurde der Überstand der Zellkulturplatten durch Ausschlagen und sanftes Klopfen auf Zellstoffunterlagen entfernt. In jedes Well wurde zur Fixierung der Zellen einer 96-Well-Platte, 100 μ l Methanol gegeben (bei 48-Well-Platten 200 μ l Methanol) und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Methanol ebenfalls durch Ausschlagen und sanftes Abklopfen auf Zellstoffunterlagen entfernt. Zum Anfärben der Zellkolonien wurde 50 μ l Kristallviolett-Lösung bei 96-Well Platten, beziehungsweise 100 μ l bei 48-Well-Platten, pro Well gegeben und weitere 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kristallviolett-Lösung bestand aus 2g Kristallviol (Merck), 125ml Methanol (Sigma) und 500ml PBS-Puffer(Biochrom). Nach 10min wurde die Kristallviolett-Lösung durch Abkippen entfernt und die Zellkulturplatten mit Aqua dest. gewaschen. Hierfür wurde ca. 200 μ l bzw. 500 μ l Aqua dest. pro Well in die Platte gegeben und der Waschvorgang 3-5 Mal wiederholt, so dass keine Verfärbungen mehr an den Seitenwänden der Well zu sehen war. Die Zellkulturplatten wurden anschließend vorsichtig auf Zellstoff abgeklopft und über Nacht zum Trocknen stehen gelassen. Die Auswertung der angefärbten Zellkolonien (colony forming assay) erfolgte mit Hilfe des Geräts Immunospot Analyzer (Cellular Technology Limited) und dessen Programm CTL Immuno Capture 6.2 per Foto-Dokumentation. Für den Nachweis intakter Zellen nach den Bestrahlungsversuchen wurden die Zellen ebenfalls wie beschrieben mit dem KV-Test gefärbt. Zur Quantifizierung im ELISA-Reader wurden die gefärbten Zellen am nächsten Tag lysiert. Hierzu wurde pro Well 200 μ l 10%-ige Essigsäure zugefügt und 30min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Der Grad der Verfärbung und somit die zugrundeliegende Zellmasse wurde mittels ELISA-Reader (Tecan GENios Plus; TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei 570nm quantifiziert.

2.4.3 Bromdesoxyuridin-Test

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein halogeniertes Pyrimidin-Analogon. Es wird an Stelle des Thymidins in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Ein primärer Antikörper bindet an das in die Zellen eingebaute BrdU und wird mittels sekundärem Antikörper sichtbar gemacht. Die Menge des intrazellulär aufgenommenen BrdU

2 Material und Methoden

korreliert mit dem Ausmaß der Zellproliferation. Um den Grad der Zellproliferation feststellen zu können, wurde ein BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Zellen wurden für die letzten 24 Stunden der Kulturdauer mit BrdU-Medium inkubiert. Hierfür wurde $20\mu\text{l}$ BrdU mit 2ml G₅ Medium vermischt und anschließend in jedes Well einer Zellkulturplatte $20\mu\text{l}$ der BrdU-Lösung gegeben. Am darauffolgendem Tag wurde der Überstand entfernt und $50\mu\text{l}$ Fixationslösung (Fixing / Denaturing Solution 1X) in jedes Well gegeben. Diese Fixationslösung ermöglicht zum einen die Fixation der Zellen und zum anderen permeabilisiert sie diese, um eine Bindung des primären Antikörpers an das im Zellkern eingebaute BrdU in der DNA zu ermöglichen. Die Fixationslösung wurde bei Raumtemperatur 30min belassen und anschließend abgekippt. Für den primären Antikörper wurde $130\mu\text{l}$ BrdU- Antikörperkonzentrat (BrdU Detection Antibody 100X) mit 13ml Antikörper-Lösung (Detection Antibody Diluent) vermischt, so dass eine einfach konzentrierte BrdU-Antikörper-Lösung entstand. Davon wurde pro Well $50\mu\text{l}$ gegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Antikörper-Lösung abgekippt und drei Mal mit je $200\mu\text{l}$ Waschpuffer (20X wash buffer; auf 1X verdünnt) pro Well gewaschen. Der primäre Antikörper bindet an das in der DNA gebundene BrdU und wird mit Hilfe eines sekundären Antikörpers nachgewiesen. Hierfür wurde wiederum $130\mu\text{l}$ des sekundären Antikörpers (Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody 100X) mit 13ml der Antikörper-Lösung (HRP-linked Antibody Diluent) verdünnt und $50\mu\text{l}$ auf die zuvor gewaschenen Wells gegeben. HRP steht für Horseradish-Peroxidase und aktiviert 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), wodurch ein blauer Farbumschlag entsteht. Die Antikörperlösung wurde für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung abgekippt und nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit jeweils $200\mu\text{l}$ Puffer entfernt. $50\mu\text{l}$ TMB- Substrat wurde jedem Well zugefügt und je nach Farbreaktion 5-30min im Dunkeln inkubiert. Durch $50\mu\text{l}$ Stopp-Lösung (0,5M H₂SO₄) wurde die Reaktion abgestoppt und bei 450nm im ELISA ausgelesen.

2.4.4 Colorimetrischer Zell-Vitalitäts-Test (WST-8)

Zur Beurteilung der Zellvitalität bei den Bestrahlungsversuchen wurde der WST-8 Test (Cell-Counting Kit-8; Sigma-Aldrich / Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. WST-8 ist ein wasserlösliches Tetrazolium-Salz und steht für (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt. Durch Reduktion entsteht aus WST-8 das gelbfarbene Produkt Formazan, welches eine maximale Absorption bei 450nm aufweist. Diese Reduktion wird in vitalen Zellen durch die Zelldehydrogenase ausgeführt. Hierbei ist die Menge des produzierten Formazans direkt proportional zu der Aktivität der Dehydrogenase, welche wiederum abhängig von der Menge vitaler Zellen ist (111). Den Zellkulturplatten wurde pro Well 15 μ l WST-8 Lösung direkt in das Zellkulturmedium zugefügt. Das Signal wurde mittels ELISA (TECAN GENios Plus) bei 450 nm nach 30min, 1h, 2h und 3h gemessen.

2.5 Chemosensitivitätstest

In den Zytotoxizitätstests sollte gezeigt werden, ob β -3OHB einen Einfluss auf die Wirksamkeit verschiedener Zytostatika ausübt. Dazu wurden die verschiedenen Zellreihen (MDA-MB 231, MDA-MB 468, BT-20) unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen angezüchtet und unterschiedliche Zytostatika mit und ohne zugefügtes 3OHB zugegeben. Die Konzentration von 3OHB betrug 3mmolar. Für die Chemotherapie bei Brustkrebs wird nach aktuellen Leitlinien ein Taxan und ein Anthrazyklin empfohlen, bei triple negativen Brustkrebszellen kann zusätzlich eine platinbasierte Therapie erfolgen (63). Wir wählten deshalb Paclitaxel, Epirubicin und Carboplatin als Chemotherapeutika für unsere Versuche aus. Die Chemotherapeutika wurden als Stocklösung von der Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg bereitgestellt. Die maximal erreichbaren Plasma-Konzentrationen dieser Chemotherapeutika wurden entsprechend den Angaben in der Literatur (64-67) für Epirubicin auf 0,5 μ g/ml, für Paclitaxel auf 13,6 μ g/ml und für Carboplatin auf 15,8 μ g/ml festgelegt. Ausgehend von diesen Wert (100% test drug concentration TDC) wurde zunächst in Vorversuchen die Konzentration der Chemotherapeutika für die jeweiligen Versuche angepasst. In diesen Vorversuchen wurde für alle Chemotherapeutika primär eine Verdünnungsreihe mit einer TDC zwischen 200% und 6,25%

2 Material und Methoden

(Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:2, entsprechend 200 - 100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25% TDC) getestet. Hierunter kam es bei Epirubicin bis zu einer TCD von 50% zum vollständigen Absterben der Zellen. Daraufhin wurden für die Versuche mit Epirubicin Konzentrationen der TDC von 25 - 12,5 - 6,25 - 3,125 - 1,56 - 0,78% (entsprechend 0,25 - 0,125 - 0,06 - 0,03 - 0,015 - 0,007 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Epirubicin pro Well) gewählt. Auch die Konzentration von Paclitaxel musste nach den Vorversuchen angepasst werden. Da hier in den Vorversuchen bei sämtlichen Konzentrationen nahezu alle Zellen abstarben, wurde für die Versuche eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:10 gewählt, so dass eine TDC von 50 - 5 - 0,5 - 0,05 - 0,005 - 0,0005% entstand (entsprechend 6,8 - 0,68 - 0,068 - 0,0068 - 0,00068 - 0,000068 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Paclitaxel). Für Carboplatin war keine Modifikation der Zytostatika-Konzentration erforderlich. Hier zeigte sich in den Vorversuchen ein ausreichendes Zellwachstum bei einer TDC zwischen 200% bis 6,25% (entsprechend 31,6 - 0,987 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Carboplatin)

Die Zellen wurden am ersten Tag abtrysiniert und in einer definierten Quantität in 100 μl G5 Medium pro Well, in einer 96 Well Zellkulturplatte, ausgesät. Es wurde jeweils 3 Platten parallel angesetzt. Die Zellen wurden im CO₂ -Inkubator bei 21% Sauerstoff für 3-4h zum Anwachsen belassen. Anschließend erfolgte für drei Tage die Anzucht der Zellen unter drei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen (21%, 5% und 1% O₂). Am vierten Tag wurde den Zellen die Zytostatika mit oder ohne 3OHB zugefügt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des BrdU-Tests (siehe Methoden BrdU-Test). Hierfür wurde an Tag 8 den Zellen 20 μl BrdU-Lösung zugefügt und nach Inkubation für weitere 24 Stunden das Ausmaß der Zellproliferation mittels ELISA ermittelt.

Die erste Versuchsreihe wurde mit den Zytostatika Epirubicin und Paclitaxel durchgeführt. Hierfür wurde pro Zelllinie und Sauerstoffbedingung eine Zellkulturplatte angelegt. Für die Plattenbelegung siehe Abbildung 2, Plattenbelegung Zytostatikaversuche Epirubicin, Paclitaxel.

2 Material und Methoden

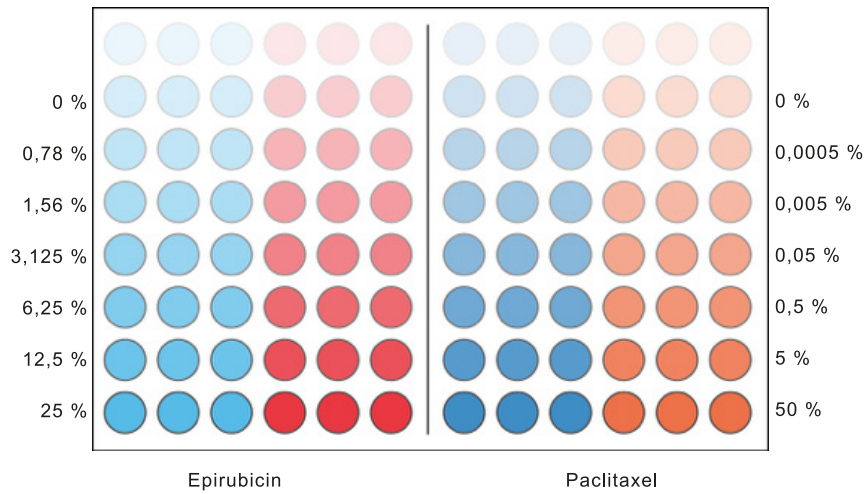


Abbildung 2: Plattenbelegung Zytostatikaversuche Epirubicin, Paclitaxel. Blau G5, rot/orange Zugabe 3OHB. Vertikal: Prozentuale Konzentration von Epirubicin und Paclitaxel.

Für die Zelllinie MDA-MB 231 wurden 250 Zellen in 100 μ l G5 Medium pro Well, wie oben beschrieben, am ersten Tag ausgesät. Bei MDA-MB 468 waren es 300 Zellen pro Well und bei BT-20 musste, nach mehreren Vorversuchen, die Zellzahl pro Well auf 2000 angehoben werden, da diese Zelllinie in Vergleich zu den anderen sehr langsam wächst.

Die zweite Versuchsreihe wurde mit dem Zytostatikum Carboplatin durchgeführt. Hierfür wurden zwei Zelllinien pro Platte ausgesät und jeweils mit Carboplatin, oder Carboplatin versetzt mit 3OHB behandelt. Für die Plattenbelegung siehe Abbildung 3, Plattenbelegung Zytostatikaversuche Carboplatin.

2 Material und Methoden

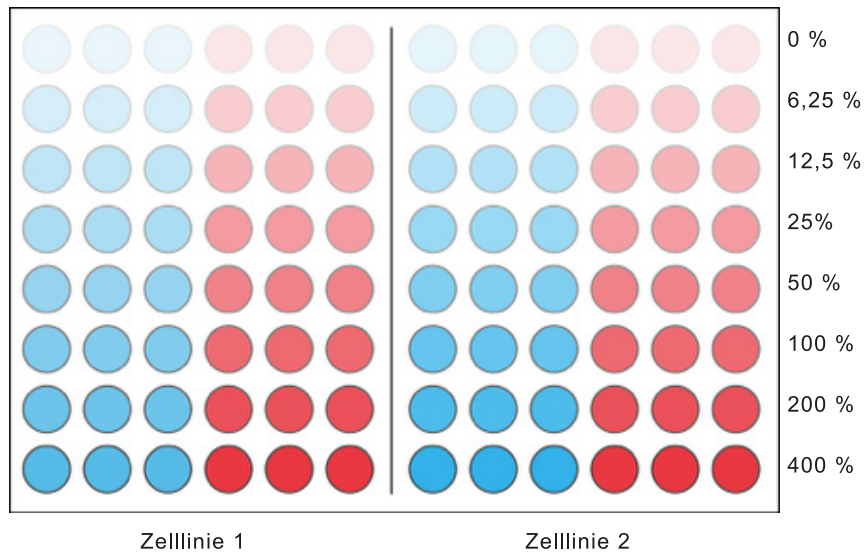


Abbildung 3: Plattenbelegung Zytostatikaversuche Carboplatin. Blau G5, rot 3OHB Zugabe. Vertikal: Prozentuale Konzentration von Carboplatin.

Die Zelllinie MDA-MB 231 wurde mit 250 Zellen pro Well am ersten Tag ausgesät. Für MDA-MB 468 waren es ebenfalls 250 Zellen pro Well. BT-20 wurden mit 2000 Zellen pro Well ausgesät. Der generelle Versuchsablauf entsprach bei Carboplatin dem Versuchsablauf von Epirubicin/Paclitaxel.

2.6 Bestrahlungsversuche

Die Bestrahlungsversuche dienten dazu herauszufinden, ob 3OHB einen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung der Bestrahlung von Tumorzellen hat. Hierfür wurden die drei Zelllinien, mit und ohne 3OHB im Medium in Zellkulturplatten ausgesät, mit verschiedenen Intensitäten (0 bis 8 Gray) bestrahlt und anschließend jeweils bei unterschiedlichen Sauerstoff-Konzentrationen (1%, 5% und 21%) weiter bebrütet. Abschließend wurde analog zu den Chemo-Sensitivitätsversuchen die Vitalität der Zellen mit dem WST 8-Test sowie die Menge der proliferierten Zellen mit dem Kristallviolett-Test gemessen. Für jede der fünf Bestrahlung-Dosen (0, 2, 4, 6 und 8 Gray) sowie ebenfalls für die drei unterschiedlichen Sauerstoff-Konzentrationen (1%, 5% und 21% O₂) wurde jeweils eine Zellkultur-Platte verwendet. Es ergaben sich somit für die Bestrahlung-Versuche insgesamt 15 Platten.

2 Material und Methoden

Die drei Zelllinien (MDA-MB 231, MDA-MB 468, BT-20) wurden in jeweils eine Spalte ausgesät. Es wurden jeweils 200 Zellen pro Well in 100 μ l G5 Medium verwendet. Die Zellkulturplatte wurde aufgeteilt in eine obere Hälfte Kontrollzellen, denen nochmals 100 μ l G5 Medium zugesetzt wurde und eine untere Hälfte, in welche 100 μ l einer 6mmolaren 3OHB-Lösung (Endkonzentration 3mM) zugegeben wurde. Die erste sowie die beiden letzten Spalten wurden zum Schutz vor Verdunstung mit PBS gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 21% Sauerstoff wurden jeweils drei Platten mit 0, 2, 4, 6 und 8 Gray in der Strahlentherapie der Universität Würzburg bestrahlt (Primus L; Siemens). Nach der Bestrahlung wurde jeweils eine Zellkulturplatte pro Strahlendosis bei 1%, 5% und 21% Sauerstoffkonzentration weiter angezüchtet. Nach acht Tagen wurden die Medien in den Wells gewechselt. Mit Hilfe einer Multistep-Pipette wurden 100 μ l Medium abgenommen und in die oberen 4 Wells 100 μ l frisches G5 Medium, in die unteren 4 Wells 100 μ l einer 3mmolaren 3OHB-Lösung hinzugefügt. Um die Vitalität der bestrahlten Zellen zu ermitteln wurde nach 14 Tagen ein WST-8 Test durchgeführt (siehe Methoden WST-8 Test). Zur Bestimmung der Proliferation erfolgte ein Kristallviolett-Test (siehe Methoden Kristallviolett-Test).

2.7 Methoden der Genexpressionsanalyse

Um die Expression verschiedener Gene in den Zellen nachweisen zu können, wurde zunächst RNA aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR vervielfältigt.

In dieser Arbeit sollte hierdurch ermittelt werden, ob eine Expression oder Überexpression von SGLT 1 und 2 Rezeptoren auf den untersuchten Mamma- Ca Zellen stattgefunden hat. Eine weiterführende Frage leitete sich hieraus ab, ob abhängig vom Rezeptorstatus eine Beeinflussung von 3OHB auf das Zellwachstum stattgefunden hat.

2.7.1 RNA Isolation

2.7.1.1 RNA Isolation aus Zellpellets

Die RNA Isolation erfolgte hierbei mithilfe des RNA easy Mini Kit 250 von QUIAGEN. Dafür wurde in einem RNase freies Eppendorfgefäß ein Lyse-Puffer aus 990 μ l

2 Material und Methoden

RLT-Puffer und $10\mu\text{l}$ Mercaptoethanol angesetzt. Das Gemisch wurde kurz auf dem Vortexer vermischt und jeweils $350\mu\text{l}$ auf die zuvor aufgetauten Zellpellets gegeben. Durch auf- und ab- pipettieren und kurzes Vortexen wurde das Zellpellet im Lyse-Puffer aufgelöst und das entstandene Gemisch in einen QuiaShredder mini spin collum gegeben. Mittels Zentrifuge (Hettich-Zentrifugen EBA 12R) wurde das Gemisch 30 Sekunden bei Raumtemperatur (20°C) und $11.000 \times g$ durch die Säule zentrifugieren. Dem Durchfluss im Sammelröhrchen wurden anschließend $350\mu\text{l}$ 70% Ethanollösung zugefügt. Die dadurch entstandene Lösung von $700\mu\text{l}$ wird anschließend in eine RNeasy-mini spin Collum Säuleneinheit überführt. In der Zentrifuge wird diese 15s bei Raumtemperatur(20°C) und $8000 \times g$ zentrifugiert, wobei sich die Nukleinsäuren an der Säulenmembran festsetzen. Im Anschluss wird das Sammelröhrchen mit Durchfluss verworfen und gegen ein neues Sammelröhrchen (2ml) ausgetauscht. Auf die Säule wurde $700\mu\text{l}$ RW1-Puffer gegeben und nochmals 15s bei Raumtemperatur und $8000 \times g$ zentrifugiert, um die Nukleinsäure zu waschen. Das Sammelröhrchen mit Durchfluss wurde abermals verworfen und ausgetauscht. Um die so gewonnene Nukleinsäure von DNA Bestandteilen zu reinigen, wurde ein DNase- Gemisch angesetzt. Hierfür wurde pro Ansatz $10\mu\text{l}$ DNase von Quiagen mit $70\mu\text{l}$ RDD-Puffer (RNase-Free DNase Set 50 von Quiagen) gemischt. Von dem DNase-Mix wurden $80\mu\text{l}$ auf die Säulenmembran gegeben und 15min unter dem Abzug bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde $700\mu\text{l}$ RW1-Puffer auf die Säule gegeben und 15s bei Raumtemperatur und $8000 \times g$ zentrifugiert, um die DNA-Fragmente abzutrennen. Der Durchfluss mit Sammelröhrchen wurde verworfen und ausgetauscht. Im Anschluss wurde $500\mu\text{l}$ RPE-Puffer auf die Säule gegeben und ein weiteres Mal 15s bei Raumtemperatur und $8000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit Sammelröhrchen verworfen und anschließend der Waschschrift wiederholt. Hierfür wurde nochmals $500\mu\text{l}$ RPE-Puffer auf die Säule gegeben und diesmal 2 Minuten bei Raumtemperatur und $8000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wird ebenfalls mit dem Sammelröhrchen entfernt und gegen ein neues eingetauscht. Um die RNA von der Membran der Säule zu lösen, wurden $50\mu\text{l}$ Nuclease freies Wasser (BioRad) kurz über die Membran gegeben und 1min bei Raumtemperatur und $8000 \times g$ zentrifugiert. Im Durchfluss findet sich die isolierte RNA. Die Menge der isolierten RNA wurde mittels Photometer quantifiziert. Hierfür wurde die RNA Lösung mit RNase freiem Wasser verdünnt und gegen RNase freies Wasser alleine in einer UV-Küvette (Uvette) mittels Photometer (BioPhotometer; Eppendorf) bei

2 Material und Methoden

einer Wellenlänge von 260nm und 230nm Referenz gemessen. Durch Rückrechnung der Verdünnung konnte die RNA Konzentration ermittelt werden.

2.7.1.2 RNA-Isolation aus 6 Well Zellkulturplatten

Für die RNA-Isolation aus den Zellkulturplatten wurde zunächst die verschiedenen Zelllinien ausgesät, weitere 4 Tage in normalem G5 Medium, oder G5 Medium versetzt mit 3OHB angezchtet und anschließend die RNA-Isolation durchgeführt. Waren die Zellen in den Zellkulturflaschen dicht bewachsen, wurden diese in einer 6- Well Zellkulturplatte ausgesät. Hierfür wurden die Zellen in den oberen 3 Well jeweils in 3ml G5 Medium pro Well ausgesät, in den unteren 3 Well wurden diese in 3ml 3mmolarer 3OHB- Lösung ausgesät. Für jede Zelllinie (MDA-MB 231, MDA-MB 468, BT-20) wurden drei Zellkulturplatten angelegt und diese zunächst im CO₂-Inkubator für 3-4 Stunden belassen. Anschließend wurden die Zellen in die verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen von 21%, 5% und 1% gegeben. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen weitere 4 Tage angezchtet. Am fünften Tag erfolgte die RNA-Isolation mit Hilfe des Direct-Zol RNA MiniPrep (Zymoresearch) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurde das Medium abgezogen und 3ml PBS-Puffer auf die Well gegeben, bis der Boden dieser vollständig bedeckt waren. Der PBS-Puffer wurde anschließend ebenfalls abgezogen und die Zellen mit 1ml TriZol lysiert. Das Lysat wurde durch auf und ab pipettieren mehrmals durchmischt und in ein 2ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dem überführten Lysat wurde im folgenden 1ml 100% iger Ethanol zugegeben und ebenfalls durch Pipettieren gut durchmischt. Das Gemisch wurde in eine ZymoSpin-Collum/Durchfluß-Einheit überführt und bei 11.000 x g für 30sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Auf die Membran der Säuleneinheit wurde 80µl DNase Reagenz gegeben, diese bestand aus 5µl DNase I und 75µl DNA Digestion Buffer pro Ansatz. Zur Auflösung überschüssiger DNA, wurde die Membran damit 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde auf die Säule 400µl PreWash-Buffer gegeben. Zur Herstellung des PreWash Buffers wurde 40ml Konzentrat mit 10ml 100% Ethanol versetzt. Nach Zugabe des Waschpuffers erfolgte eine Zentrifugation bei 11000 x g für 30sec. Der Durchfluss wurde verworfen und 700µl RNA-Wash Buffer auf die Säule gegeben. Zur Herstellung des RNA-Wash Buffers wurden 12ml Konzentrat mit 48ml 100% Ethanol vermischt. Es erfolgte abermals eine Zentrifugation bei 11.000 x g für 30sec und es wurde ebenfalls der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde auf die Mem-

2 Material und Methoden

bran der Säuleneinheit $50\mu\text{l}$ RNase-freies Wasser gegeben und bei $11.000 \times g$ für 30sec zentrifugiert. Die RNA befand sich daraufhin im Durchfluss und wurde mittels Eppendorf-Photometer quantitativ bestimmt.

2.7.2 cDNA Herstellung

Die zuvor isolierte RNA wurde mithilfe des cDNA Synthesis Kits von Bio Rad nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde für jede Zelllinie etwa die gleiche Menge RNA in ein RNase freies Eppendorf-Gefäß gegeben. Diesem wurde $4\mu\text{l}$ 5X iScript Reaction Mix zugefügt, $1\mu\text{l}$ iScript Reverse Transcriptase und mit Nuclease freiem Wasser auf $20\mu\text{l}$ aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 5min bei Raumtemperatur belassen und danach für 20min auf 46°C erwärmt. In dieser Zeit wurde die RNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde gestoppt, indem das Reaktionsgemisch anschließend 1min auf 95°C erhitzt wurde. Die Eppendorfgefäße samt Reaktionsgemisch wurde danach kurz zur Abkühlung auf Eis gestellt, sowie anschließend abzentrifugiert, damit gebildetes Kondenswasser nicht die Konzentrationen der cDNA verfälschen konnte.

2.7.3 PCR

Um die Genexpression von SGLT₁ und SGLT₂ der verschiedenen Zelllinien feststellen zu können, wurde die zuvor gewonnene cDNA mittels PCR amplifiziert. PCR steht für Polymerase Ketten Reaktion und besteht aus drei verschiedenen Schritten. Der Denaturierung, in welcher die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt werden, dem Annealing, wobei sich die Primer an die voneinander getrennten DNA-Stränge anlagern und der Elongation, hier werden die komplementären DNA-Stränge durch die Polymerase gebildet. Je nach verwendetem Primer werden unterschiedliche Genabschnitte vervielfältigt. Für die Durchführung der PCR wurden die benötigten Chemikalien von der Firma Promega verwendet und nach Herstellerangaben benutzt. Es wurde ein Ansatz hergestellt, der pro Probe aus $12,5\mu\text{l}$ GoTaq G2 Colorless Mastermix 2X, $1\mu\text{l}$ upstream Primer, $1\mu\text{l}$ downstream Primer, $9,5\mu\text{l}$ Nuclease-Free Water und $1-5\mu\text{l}$ cDNA template bestand. Der PCR-Ansatz wurde in PX2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation) gegeben. Für die erste Versuchsreihe wurde die gewonnen cDNA aus Zellpellets verwendet, in der zweiten Versuchsreihe

2 Material und Methoden

wurde die cDNA aus 6 Well Zellkulturplatten hergestellt. Hierbei wurde die PCR für PBDG mit einer Annealing Temperatur von 60°C und 35 Zyklen durchgeführt. Die Primer (PBDG 12/1- 14/1) wurde dabei aus der Stocklösung 1:50 verdünnt. Bei SGLT1 wurden für die Zelllinien BT-20 und MDA-MB 231 die PCR mit 40 Zyklen und einer Annealing Temperatur von 61 °C durchgeführt. Die Primer (SGLT1-F1 bzw. SGLT1-R1) wurden 1:40 verdünnt. Die Zelllinie MDA-MB 468 exprimiert im ersten Versuchsdurchlauf das Protein SGLT1 über, weshalb die PCR für diese Zelllinie mit 33 Zyklen wiederholt wurde. Im zweiten Versuchsdurchlauf exprimierten diese SGLT1 nicht über, so dass die PCR wie die anderen Zelllinien mit 40 Zyklen durchgeführt wurde. Für SGLT2 wurden die Primer (SGLT2/SLCA2 F1-R1) 1:100 verdünnt. Im ersten Versuchsdurchlauf erfolgte eine PCR mit 40 Zyklen und einer Annealing Temperatur von 61°C. Da sich hierbei keine Banden zeigten, wurde der Versuch mit gefällter cDNA wiederholt (siehe Methoden Fällung der cDNA), sowie eine PCR mit 5facher Menge an cDNA durchgeführt, um im Falle einer sehr schwachen Expression, eine Bande sichtbar machen zu können. Im zweiten Versuchsdurchlauf wurde die cDNA, wie zuvor bei SGLT1, aus 6 Well Zellkulturplatten gewonnen.

	Annealing (°C)	Zyklen	Primer Sequenz (5'-3')	Bp
PBDG	60	35	GGAAGTGCAGCCAAG GACCAGGAAGGGACAT GGATGGTAGCCTGCAT	240
SGLT1	61	40	GCATCGCCTGGGTGCCC ATTGCACCGTGCTGCTC TAGCCC	514
SGLT2	61	40	GGTGCTGCTACTGGGC TGGCTCCCACGGCTGG ATCCTCGG	433

Tabelle 1: Übersicht Eckdaten PCR Durchführung.

2.7.4 Darstellung der PCR-Produkte mittels Agarosegel

Die hergestellten PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe einer UV-Lampe zur Darstellung gebracht. Bei dem Agarosegel handelte es sich um ein 1,5%-iges Gel, welches aus 150ml TBE- Puffer (10,8g TRISbase;5,5g

2 Material und Methoden

Borsäure; 4ml 500mM EDTA), 2,25g Agarose (High melting TopVision Fermentas) und 7,5 μ l Ethidiumbromid (Ethiumbrmid-Solution 10mg/ml) bestand. Der TBE-Puffer wurde hierfür mit der Agarose gemischt und bei höchster Stufe 1min in einer Mikrowelle erhitzt. Durch Schwenken wurde alles durchmischt und kontrolliert, ob die Agarose sich vollständig gelöst hat. War dies nicht der Fall wurde das Gemisch weitere 30sec in der Mikrowelle erhitzt, wieder entnommen und unter Schwenken nochmals kontrolliert. War Agarose restlos im TBE-Puffer gelöst, wurde die Lösung unter einem fließenden Wasserstrahl ebenfalls unter Schwenken abgekühlt. Der abgekühlten Lösung wurde anschließend die 7,5 μ l Ethidiumbromid zugesetzt und abermals durch Schwenken vermischt. In einer zuvor vorbereiteten Gießstation wurde das Gel vorsichtig eingegossen. Sich gebildete Luftblasen wurden mit Hilfe eines Deckgläschens abgezogen und am Rand entfernt. In das gegossene Gel wurden Kämmen eingesetzt, diese bilden später die Taschen zur Beladung der Proben aus. Das Gel wurde zur Aushärtung 30min bei Raumtemperatur belassen. Von den PCR-Produkten wurden 10 μ l mit 2 μ l Gelloading Buffer (6X DNA loading; Thermo Scientific) vermischt und davon 10 μ l in die ausgehärteten Geltaschen gegeben. Zusätzlich zu den Proben wurde eine Standard Probe aufgetragen (Gene Ruler 1kb plus DNA ladder; Thermo Scientific), sowie eine Negativkontrolle, diese bestand ausschließlich aus dem Primer-Ansatz. Als Positivkontrolle diente eine mit Nieren-cDNA (BioChain-normal tissue/adult) durchgeführte PCR. Das Gel wurde 45min bei 120V, 180mA und 22W laufen gelassen. Das Ergebnis wurde unter einem UV-Schirm mit Hilfe einer Digitalkamera aufgezeichnet.

2.7.5 Westernblot

Mit Hilfe des Westernblots sollte verifiziert werden, dass die Zellen sich während den Versuchen in verschiedenen Hypoxiezuständen befanden. Hierfür wurde als Ladekontrolle β -Aktin verwendet, als Hypoxiemarker diente CA IX. CA IX katalysiert die reversible Hydratation von Kohlendioxid (CO₂) und wird unter Hypoxie in Tumorzellen hochreguliert. Zur Auftrennung der Proteine im Westernblot wurde ein Acrylamid/-Bis Acrylamidgel, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenn-Gel gegossen. Der obere Anteil des Gels besteht hierbei aus dem Sammelgel, dieses besitzt eine größere Porengröße, wodurch die Proteine durch dieses hindurch wandern können ohne dabei aufgetrennt zu werden. In das Sammelgel werden die Proben auf-

2 Material und Methoden

getragen und durchwandern dieses bis zum Übergang von Sammelgel auf Trenngel. Der untere Teil des Gels bestehend aus dem Trenngel und ist durch die kleinere Porengröße, sowie höheren Salzgehalt in der Lage die Proteine nach ihrer Größe und Ladung unter Spannung aufzutrennen. Für das Trenngel wurde 10,6ml Aqua dest. mit 2,5ml 3 molarer Tris/base pH8,9(Sigma) vermischt. Des Weiteren wurde dem Trenngel 6,6ml 30%-iges Acrylamid/Bisacrylamid (Sigma) zugefügt, sowie 200 μ l 10%-iges Ammoniumpersulfat (Sigma) und 200 μ l 10%-iges SDS (Roth). Zur Polymerisation des Gels wurde unter dem Abzug 10 μ l Temed (Biorad) zugegeben und durchmischt. Die hergestellte Gellösung wurde in eine Gießstation, zwischen die beiden Glasplatten gegossen und für 30min bei Raumtemperatur ausgehärtet. Für das Sammelgel wurde 3,6ml Aqua dest. mit 650 μ l 0,5 molarer Tris/base pH6,7 vermischt. Anschließend wurde dem Sammelgel-Ansatz 700 μ l 30%iges Acrylamid/Bisacrylamid zugefügt, sowie 200 μ l 10%iges Ammoniumsulfat und 50 μ l 10%iges SDS. Der Ansatz wurde durchmischt und unter einem Abzug zur Auspolymerisation 2,5 μ l Temed hinzugefügt. Das Sammelgel wurde nach Aushärtung des Trenngels auf dieses gegeben, der Kamm für die Probenaschen eingesetzt und ebenfalls für 30min bei Raumtemperatur ausgehärtet.

Die für den Westernblot benötigten Proteine wurden aus den zuvor hergestellten Zellpellets isoliert (siehe Methoden Herstellung Zellpellets) und photometrisch die Proteinmenge quantifiziert. Zur Isolation der Proteine wurden die Zellpellets aufgetaut und mittels RIPA-Puffer lysiert. Für den Lyse-Puffer wurden 900 μ l RIPA-Puffer (Thermo Scientific) mit 1 μ l 2molarer Dithiothreitol-Lösung (DTT, Sigma) und Complete Protease Inhibitor (CompleteMini, Roche), Phosphatase II-Inhibitor (PhosphoStop, Roche) vermischt. Die in Tablettenform vorliegenden Protease / Phosphatase Inhibitoren wurde nach Angaben des Herstellers in Aqua dest. gelöst und eingesetzt. Es wurden 200 μ l Ripa-Puffer auf jedes Zellpellet gegeben und auf Eis 30min lysiert. Alle 10min wurden die Proben für 30sec durch vortexen durchmischt. Im Anschluss wurde das Lysat bei 11.000 x g für 15min zentrifugiert, um dieses von ungelösten Strukturen zu befreien. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf) überführt. Der Probe wurden wiederum 5 μ l in ein weiteres Zentrifugenröhrchen entnommen und mit 5 μ l Aqua dest. 1:2 verdünnt. Der verdünnten Proteinlösung wurde 1000 μ l Roti Quant/ Bradford Reagenz (Roth) hinzugefügt und gegen den Nullwert von reiner RIPA-Puffer-Lösung photometrisch gemessen. Die Messung erfolgte mittels BioPhotometer (Eppendorf)

2 *Material und Methoden*

bei einer Wellenlänge von 590nm. Für den Westernblot sollte jede Probe 30 μ g Protein enthalten. Hierfür wurden die entsprechenden Mengen der zuvor gemessenen Proben entnommen und mit RIPA-Puffer auf ein gleiches Volumen gebracht. Der Ansatz wurde mit sample loading buffer (BioRad) vermengt. Dem loading buffer wurde 4molares DTT so zugefügt, dass am Ende eine Endkonzentration von DTT von 100mmolar in der Probe entstand. Der mit loading buffer versetzte Ansatz wurde für 5min bei 99°C erhitzt. Die Proben wurden auf Eis gestellt und nach Abkühlen das Kondensat abzentrifugiert. Die vorbereiteten Proteinproben wurden zusammen mit einem Proteinstandard in die Probentaschen des Sammelgels gegeben. In der Elektrophoresekammer befand sich ein Elektrophoresepuffer, welcher aus 18,75g Glycine (Gibco) gelöst in 1L Aqua dest. und 3,03g Trisbase, sowie 1g SDS bestand. Das Gel wurde unter eine Spannung von 80V gesetzt und diese auf 120V erhöht, sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten. Unter dieser Spannung wurden die Proteine aufgetrennt bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Der Stromfluss wurde beendet und die Proteinbanden aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Für das Blotten wurde zuvor eine Nitrocellulosemembran zwischen jeweils 3 Whatman-Papieren für 10min in Transferpuffer auf einer Wippe (Heidolph Duomax 1030) äquilibriert. Der Transferpuffer bestand aus 14,4g Glycin, welches in 800ml Aqua dest. gelöst wurden. Der Lösung wurden anschließend 3,03g Tris base, 0,37g SDS und 200ml Methanol zugefügt. Es wurde ein Semi-dry Blot durchgeführt, bei welchem sich zwischen den drei Whatman-Papieren oben und unten die Nitrocellulosemembran und das Gel befanden. Diese wurden auf eine Graphitelektrode aufgelegt, die Blotkammer (Roth) vorsichtig verschlossen und bei 1,5mA/cm² (Powersupply, Concert) für 1,5h geblottet. Der Erfolg des Blottens wurde durch Anfärben der Proteinbanden mit Ponceau-Rot (Ponceau S Solution, Sigma) überprüft. Die Membran wurde hierfür 5min mit Ponceau-Rot angefärbt und anschließend mit Aqua dest. wieder entfärbt bis die einzelnen Proteinbanden sichtbar wurden. Die restliche Farblösung wurde mit PBS/Tween 20 auf der Wippe für 10min ausgewaschen. Die PBS/Tween 20 Lösung wurde mit einer Konzentration von 0,01% Tween 20 (Sigma) gelöst in PBS angesetzt. Die Membran wurde im Anschluss 1h mit 5%-iger Magermilchlösung geblockt und danach mit PBS/Tween 20 abermals gewaschen. Für die Magermilchlösung wurden 2,5g Magermilchpulver auf 50ml mit PBS/Tween20 aufgefüllt und durchmischt. War der Blot erfolgreich, wurde der primäre Antikörper über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Hier-

2 Material und Methoden

bei wurde als primärer Antikörper ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen β -Aktin (clone: mAb 8226; abcam) in der Verdünnung 1:10.000 verwendet. Es wurde hierfür $1\mu\text{l}$ β -Aktin-Antikörper zu 10ml 2%-iger Magermilchlösung gegeben. Für die Magermilchlösung wurde 1g Magermilchpulver auf 50ml mit PBS/Tween20 aufgefüllt und durchmischt. Für den Hypoxiemarker CA IX (CA IX rabbit polyclonal; GeneTex) wurde der Antikörper 1:1000 verdünnt, also $10\mu\text{l}$ Antikörperlösung in 10ml 2%-iger Magermilchlösung gegeben und vermischt. Am nächsten Tag wurden ungebundenen primäre Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS/Tween20 für 10min auf der Wippe wieder entfernt. Es wurde der entsprechende sekundäre Antikörper in einer Konzentration von 1:10.000 bei β -Aktin (goat-anti-mouse HRP; KPL), bei CA IX 1:20.000 (goat-anti-rabbit HRP; abcam) auf die Membran gegeben und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper wurden hierfür ebenfalls in einer 2%-igen Magermilchlösung angesetzt. Nach 1h wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS/Tween20 entfernt. Es erfolgte eine Inkubation der Membran mit 3ml ECL-Reagenz für 3min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Für das ECL-Reagenz wurde zunächst ein Reagenz A bestehend aus 200ml 0,1M Tris/HCL pH8,6 mit 50mg Luminol (Luminol sodium salt, Sigma) vermischt. Es wurde außerdem ein Reagenz B angesetzt, welches aus 11mg Coumarinsäure (p-Cumaric acid, Sigma) gelöst in 10ml Dimethylsulfoxide (DMSO, HybriMax) bestand. 3ml von Reagenz A wurden mit $300\mu\text{l}$ von Reagenz B vermischt. Zur Herstellung des ECL-Reagenz wurde diesen Gemisch $0,9\mu\text{l}$ 30%-ige H_2O_2 -Lösung zugefügt. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm (Super RX-N, Fujifilm) in eine Röntgenkassette exponiert. Umgesetztes ECL Reagenz schwärzt den Röntgenfilm nach Entwicklung mit Fotochemikalien. Für gewöhnlich betrug die Inkubationszeit in der Röntgenkassette 1-2min, diese konnte aber auch nach Bedarf ausgedehnt werden.

2.8 Auswertung und Statistik

Soweit nicht anders angegeben sind die Daten als Mittelwert (+/- Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Bei nicht normal verteilten Daten erfolgte der Vergleich mit dem Kruskal-Wallis-Test oder dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die Software GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA 92037, USA) wurde benutzt, um die Daten

2 Material und Methoden

graphisch darzustellen und zu vergleichen. Die IC₅₀ wurde mittels der nichtlinearen dose-response Funktion der Prism Software ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumsvergleich G₅-Medium und 3OHB

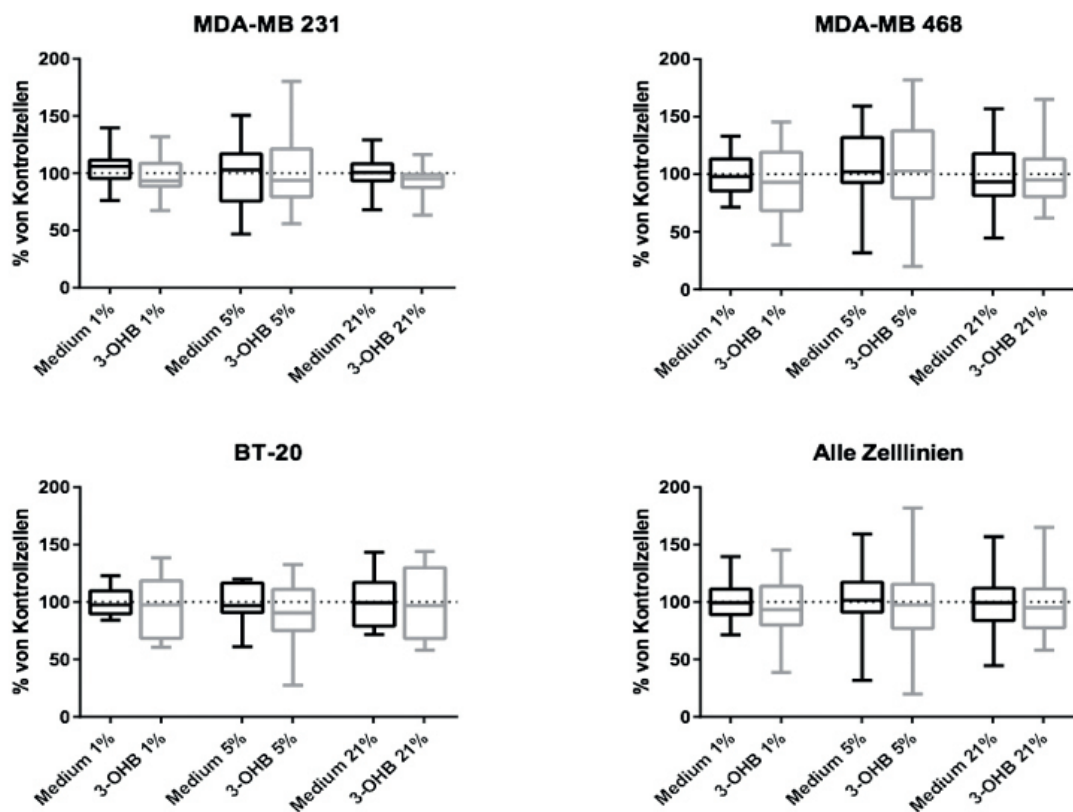


Abbildung 4: Wachstumsvergleich der Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 468 und BT-20 zwischen normalem G₅ Medium im Vergleich zu Medium versetzt mit 3OHB, unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 1%, 5% und 21%. Box and Whiskers Graphik mit Darstellung des Medianwerts, Interquartilsbereich, oberes und unteres Whisker.

3 Ergebnisse

Für den Wachstumsvergleich wurde nach 9-tägiger Kultivierung mittels BrDU-Test das prozentuale Wachstum der Zellen ermittelt. Als Referenzwert (100% entsprechend) diene hierbei der Mittelwert der optischen Dichtewerte aus den Kontrollansätzen der Chemosensitivitätstests (siehe Material und Methoden 2.5 Chemosensitivitätstest, sowie 3.6 Chemosensitivitätstestung). Dieser wurde ins Verhältnis zur optischen Dichte der Zellen unter G5-Medium und unter 3OHB Medium (3mM) gesetzt. Die graphische Darstellung des Wachstumsvergleichs ist in Abbildung 4 zu finden.

Für die Zelllinie MDA-MB 231 lagen die optische Dichtewerte in G5-Medium bei allen drei Sauerstoff-Konzentrationen um den 100%-Referenzwert (1% O₂: 105,9 [95,4- 111,4]; 5% O₂: 102,9 [75,7- 116,9]; 21% O₂: 100,6 [93,4- 108,2]). Die Zugabe von 3OHB in das Kulturmedium bewirkte tendenziell bei allen drei Sauerstoff-Konzentrationen eine reduzierte Zellteilung (1% O₂: 93,2 [88,7- 108,6]; 5% O₂: 93,8 [79,4- 121,3]; 21% O₂: 95,3 [87,6- 98,9]). Der Unterschied war allerdings nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,5$). Eine Beeinflussung des Zellwachstums der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB 231 durch 3OHB alleine konnte somit nicht beobachtet werden. Die verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen hatten ebenfalls keinen erkennbaren Einfluss auf die Proliferation der Zellen.

MDA-MB 468:

Für die Zelllinie MDA-MB 468 lagen die optische Dichtewerte in G5-Medium bei allen drei Sauerstoff-Konzentrationen um den 100%-Referenzwert (1% O₂: 98,0 [85,6- 113,3]; 5% O₂: 102,0 [92,9- 132,0]; 21% O₂: 93,5 [81,5- 117,8]). Die Werte nach Zugabe von 3OHB in das Kulturmedium waren bei allen drei Sauerstoff-Konzentrationen vergleichbar (1% O₂: 93,1 [68,3- 119,3]; 5% O₂: 102,1 [79,4-137,8]; 21% O₂: 95,0 [80,5- 113,3]). Der Unterschied war nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,9$). Eine Beeinflussung des Zellwachstums der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB 468 durch 3OHB konnte nicht beobachtet werden. Die verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen hatten ebenfalls keinen erkennbaren Einfluss auf die Proliferation der Zellen.

BT-20:

Für die Zelllinie BT-20 lagen die optische Dichtewerte in G5-Medium bei allen drei Sauerstoff-Konzentrationen minimal unterhalb des 100%-Referenzwertes (1% O₂: 97,5 [89,8- 109,8]; 5% O₂: 97,0 () [90,8- 116,5]; 21% 99,4 [79,1- 117,1]). Die Werte nach Zugabe von 3OHB in das Kulturmedium waren bei allen drei Sauerstoff-

3 Ergebnisse

Konzentrationen vergleichbar (1% O₂: 97,5 [68,5- 118,6]; 5% O₂: 90,5 [75,3- 111,0]; 21% O₂: 97,0 [68,2- 129,9]). Der Unterschied war nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,9$). Eine Beeinflussung des Zellwachstums der Brustkrebs-Zelllinie BT 20 durch 3OHB konnte nicht beobachtet werden. Die verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen hatten ebenfalls keinen erkennbaren Einfluss auf die Proliferation der Zellen.

Insgesamt lässt sich nach Kultivierung für neun Tage bei keiner der drei Zelllinien ein signifikanter Unterschied der Zellproliferation und somit des Zellwachstums unter 3OHB im Vergleich zu normalem G₅-Medium beobachten. Auch die aggregierte Analyse aller drei Zelllinien ergab keine relevanten Unterschiede im Wachstum (Abbildung 4).

3.2 Wachstumsvergleich mittels colony formation assay

Der colony formation assay ist eine weitere Möglichkeit, das Zellwachstum qualitativ über einen längeren Zeitraum hinweg zu beurteilen. Hierfür wurden die Zelllinien wiederum in normalem Medium und Medium versetzt mit 3OHB ausgesät und jeweils bei 21%, 5% und 1% Sauerstoff angezüchtet. Die Zellen wurden abhängig von der Zelllinie und deren Wachstumsverhalten nach einer Kulturdauer von 5 Tagen (MDA-MB 231), 7 Tagen (MDA-MB 468) und 10 Tagen (BT-20) mittels Kristallviolett angefärbt und visuell ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

3 Ergebnisse

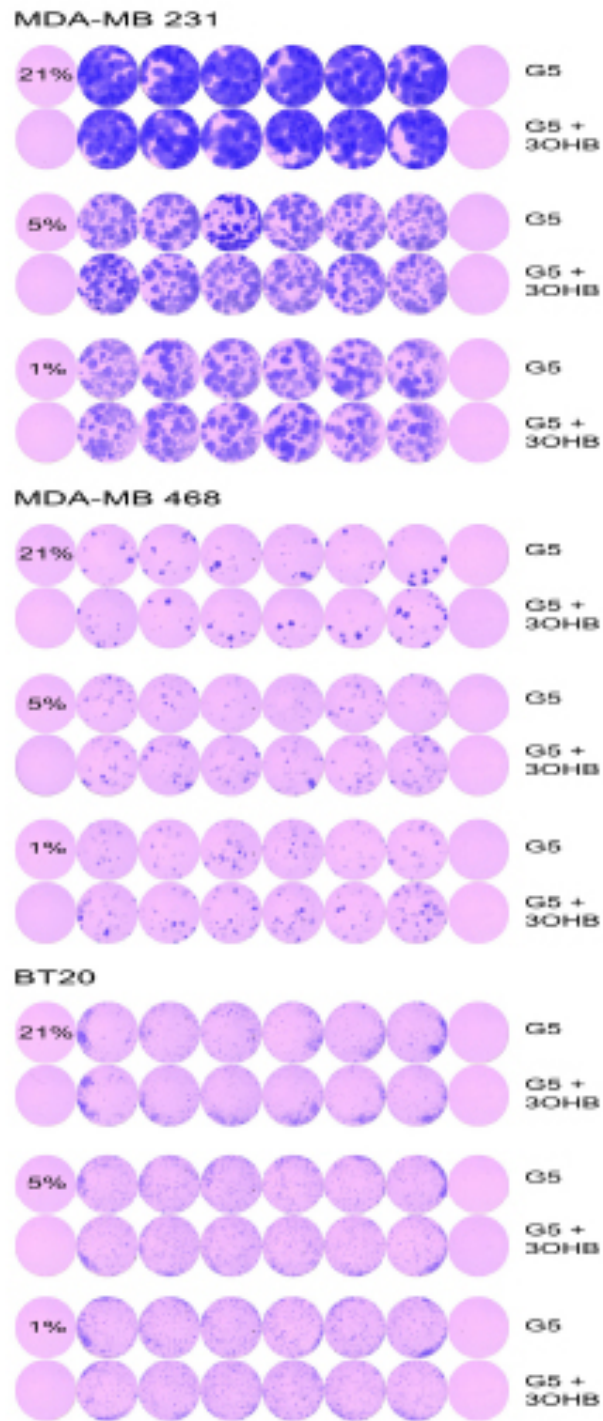


Abbildung 5: Wachstumsvergleich der Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 468 und BT-20, angezüchtet unter normalem Medium und Medium versetzt mit 3OHB, sowie unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21%, 5% und 1%. Die Zellen wurden in 48 Well Platten ausgesät.

3 Ergebnisse

MDA-MB 231:

Die Zelllinie bildete sowohl unter normalem Medium, sowie Medium versetzt mit 3OHB großflächige Zellkulturen aus. Stärkstes Wachstum konnte bei 21% Sauerstoff beobachtet werden, unter 5% und 1% war dieses etwas schwächer ausgeprägt. Ein Unterschied im Wachstumsverhalten in Kulturmedium mit 3-OHB konnte unter keiner der drei getesteten Sauerstoffbedingungen festgestellt werden. MDA-M468: Die Zelllinie bildete mittelgroße alleinstehende Zellkolonien aus. Unter 21% Sauerstoff wuchsen die Zellen am besten. Bei 5% und 1% Sauerstoff konnte beobachtet werden, dass bei der Kristallviolett-färbung sich einige Zellen unter dem Färbeprozess ablösten. Dies geschah sowohl unter normalem Medium, als auch unter Medium versetzt mit 3OHB. Bei allen drei Sauerstoffbedingungen konnte kein Unterschied im Wachstum unter 3OHB beobachtet werden. BT-20: Die Zelllinie bildete zahlreiche kleine Kolonien aus, welche bevorzugt am Rand der Wells zu finden waren. Im Gegensatz zu den anderen Zelllinien war das stärkste Zellwachstum in dieser Zelllinie im niedrigen Sauerstoffbereich von 5% und 1% Sauerstoff zu finden. Unter Einfluss von 3OHB konnte bei allen drei Sauerstoffbedingungen kein Unterschied im Wachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden.

Insgesamt konnte auch im colony formation assay bei keiner der drei Zelllinien visuell ein Unterschied im Zellwachstum unter 3OHB im Vergleich zu normalem Medium festgestellt werden. Unterschiede im Wachstum konnten unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen beobachtet werden.

3.3 Glukose, Laktat, 3OHB Bestimmung

Als Maß für die Stoffwechselaktivität der Tumorzellen wurde der Verbrauch von Substrat (Glukose, 3OHB) sowie die Bildung von Laktat im Nährmedium gemessen. Die Bestimmung erfolgte nach Kultivierung der Zellen für neun Tage. Die Tabellen 2 bis 4 zeigen die Werte für MDA-MB 231 (Tabelle 2), MDA-MB 468 (Tabelle 3) und BT-20 (Tabelle 4). Ein Einfluß von 3OHB auf den Glukoseverbrauch oder die Laktatbildung war bei keiner Zellreihe erkennbar. Die Ergebnisse aller drei Zellreihen sind graphisch in Abbildung 6 dargestellt.

3 Ergebnisse

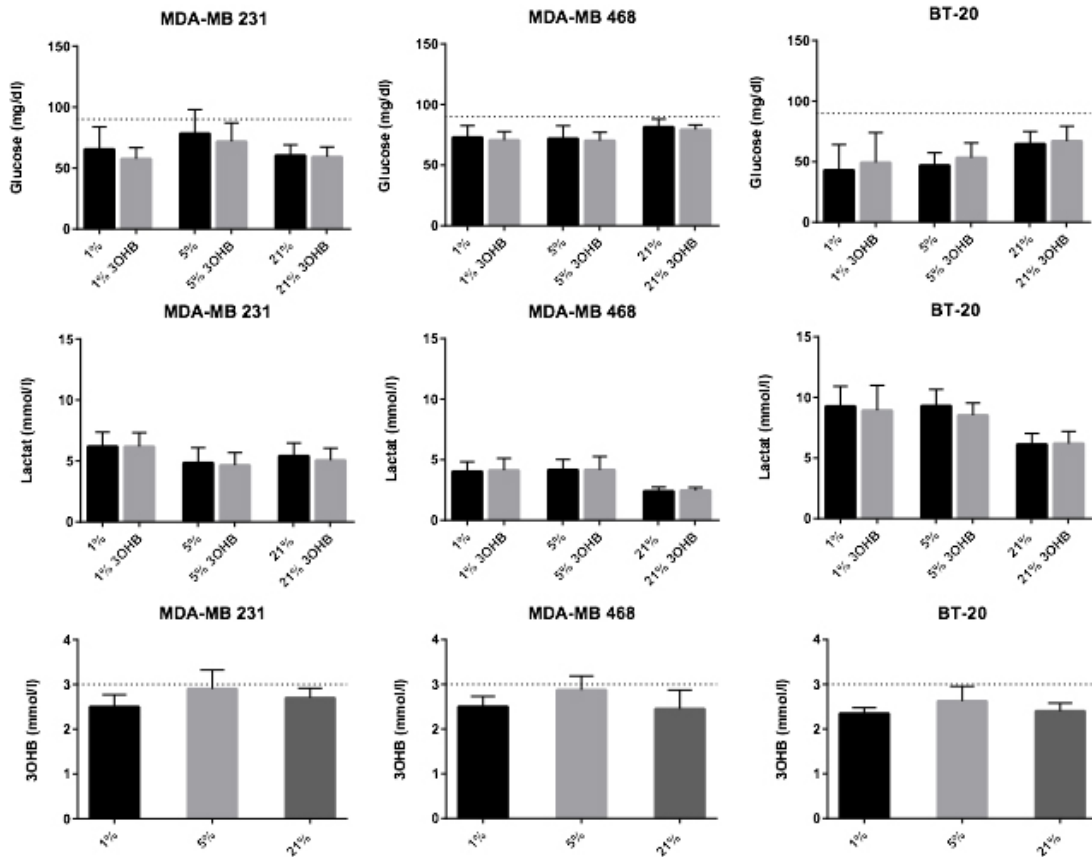


Abbildung 6: Verbrauch der Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 468 und BT-20 von Glucose(mg/dl), Laktat(mmol/l), 3OHB(mmol/l) unter normalem Medium, sowie Medium versetzt mit 3OHB 9 Tage nach Anlage der Zellkultur, unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 1%, 5% und 21%. Die gestrichelte Linie gibt jeweils den Ausgangswert der Metabolite im Zellmedium an.

Hohe Laktatkonzentrationen zeigten sich korrespondierend bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen von 5 und 1%. Die gemessene 3 OHB Konzentration zeigte sich bei den Zelllinien MDA MB 231 und MDA MB 468 identisch der zugeführten Menge. Es fand somit bei diesen beiden Zelllinien keine Verstoffwechslung von 3OHB statt. Bei BT-20 zeigte sich entsprechend einer Verstoffwechslung eine leicht erniedrigte 3OHB Konzentration. Insgesamt zeigte BT-20 von allen Zelllinien den höchsten Glukose- und 3OHB-Verbrauch sowie korrespondierend die höchsten Laktatwerte unter allen Sauerstoff-Konzentrationen.

3 Ergebnisse

	Mittelwert (Min.- Max.) 1%	Mittelwert (Min.- Max.) 1% + 3OHB	Mittelwert (Min.- Max.) 5%	Mittelwert (Min.- Max.) 5% + 3OHB	Mittelwert (Min.- Max.) 21%	Mittelwert (Min.- Max.) 21% + 3OHB
Glucose (mg/dl) Ausgangswert: 90 mg/dl	65,4 (46,7 - 90,2)	57,6 (50 - 69,7)	78,3 (59 - 100)	71,8 (56,6 - 91,8)	60,5 (52,5 - 70,5)	59,3 (51,7 - 70,5)
Laktat (mmol/l) Ausgangswert: 0 mmol/l	6,2 (4,5 - 7)	6,2 (4,5 - 7,1)	4,9 (3,7 - 6,2)	4,7 (3,7 - 5,9)	5,4 (3,8 - 6,0)	5,1 (3,6 - 5,8)
3OHB (mmol/l) Ausgangswert: 3mmol/l		2,5 (2,3 - 2,9)		2,9 (2,6-3,5)		2,7 (2,4 - 2,9)

Tabelle 2: Übersicht Glukose, Lactat und 3OHB Werte unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen für die Zelllinie MDA-MB 231

	Mittelwert (Min.- Max.) 1%	Mittelwert (Min.- Max.) 1% + 3OHB	Mittelwert (Min.- Max.) 5%	Mittelwert (Min.- Max.) 5% + 3OHB	Mittelwert (Min.- Max.) 21%	Mittelwert (Min.- Max.) 21% + 3OHB
Glucose (mg/dl) Ausgangswert: 90 mg/dl	73,0 (62,3 - 81,2)	70,5 (65,5 - 78,7)	71,9 (60,7 - 8)	70,3 (63,1 - 77,1)	81,5 (73,8 - 85,3)	79,3 (76,3 - 83,6)
Laktat (mmol/l) Ausgangswert: 0 mmol/l	4,0 (3,2 - 4,8)	4,1 (3 - 4,8)	4,2 (3,3 - 5,1)	4,2 (3,3 - 5,4)	2,4 (2,2 - 2,8)	2,5 (2,2 - 2,7)
3OHB (mmol/l) Ausgangswert: 3mmol/l		2,5 (2,3 - 2,7)		2,9 (2,6-3,3)		2,5 (1,9 - 2,9)

Tabelle 3: Übersicht Glukose, Lactat und 3OHB Werte unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen für die Zelllinie MDA-MB 468.

3 Ergebnisse

	Mittelwert (Min.- Max.) 1%	Mittelwert (Min.- Max.) 1% + 3OHB	Mittelwert (Min.- Max.) 5%	Mittelwert (Min.- Max.) 5% + 3OHB	Mittelwert (Min.- Max.) 21%	Mittelwert (Min.- Max.) 21% + 3OHB
Glucose (mg/dl) Ausgangswert: 90 mg/dl	43 (19 - 59)	49,3 (22 - 70)	47 (35 - 54)	53,3 (40 - 64)	64,7 (53 - 72)	67 (53 - 76)
Laktat (mmol/l) Ausgangswert: 0 mmol/l	9,3 (7,9 - 11,1)	8,9 (7,6 - 11,3)	9,3 (7,8 - 10,5)	8,5 (7,6 - 9,6)	6,1 (5,2 - 7)	6,2 (5,2 - 7,2)
3OHB (mmol/l) Ausgangswert: 3mmol/l		2,4 (2,2 - 2,5)		2,6 (2,4 - 3,1)		2,4 (2,2 - 2,6)

Tabelle 4: Übersicht Glukose, Lactat und 3OHB Werte unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen für die Zelllinie BT-20.

3.4 Expression des SGLT1 und SGLT2 Rezeptors

Die Expression der Natrium /Glucose-Cotransporter SGLT1 und SGLT2 wurde mittels PCR analysiert, da hier eine tumorspezifische Hochregulation dieser Rezeptoren vermutet wurde. Als Kontrolle einer erfolgreichen cDNA Herstellung diente die mRNA- Expressionsanalyse von PBDG. Hier zeigte sich für alle Zelllinien eine positive PBDG Expression, die PCR-Bande lief auf der korrekten Höhe von 240bp. Es konnte somit eine erfolgreiche cDNA Gewinnung sichergestellt werden. Als Kontrolle für die erfolgreiche Amplifikation des Zieltargets (SGLT 1 und SGLT 2) wurde Nierengewebe-RNA verwendet.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 zusammengefasst und zeigt die Expression von PBDG der verschiedenen Zelllinien, sowie die SGL-Expression.

3 Ergebnisse

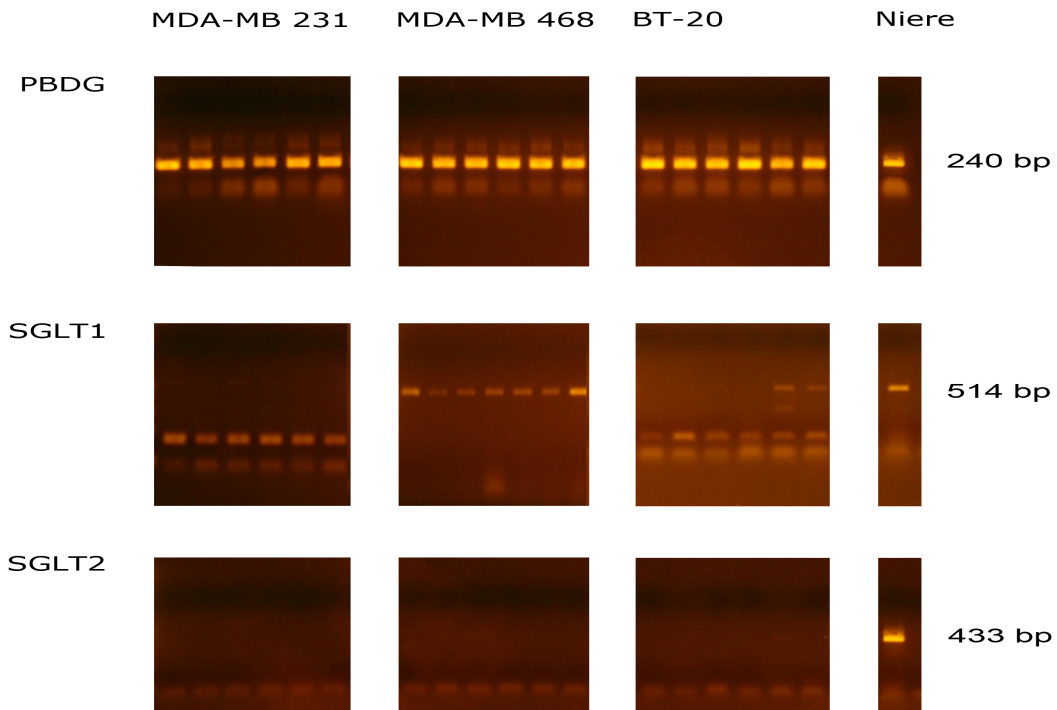


Abbildung 7: mRNA- Expression von PBDG, SGLT1 und SGLT2 der Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 468 und BT-20, Darstellung mittels PCR. Aufgetragen von links nach rechts: Standard-Leiter MDA-MB 231: 21% G5; 21% 3OHB; 5% G5; 5% 3OHB; 1% G5; 1% 3OHB, MDA-MB 468, BT 20 in gleicher Weise aufgetragen, Niere als Positivkontrolle für SGLT 2.

MDA-MB 231:

Auf Höhe des SGLT1 Rezeptors konnte kein Signal festgestellt werden. Somit konnte unabhängig von der Sauerstoffkonzentration und unabhängig von der Zugabe von 3OHB keine Expression der mRNA des SGLT1-Rezeptors beobachtet werden.

MDA-MB 468:

Bei der Zelllinie konnte eine starke Expression des SGLT1-Rezeptors beobachtet werden. Besonders ausgeprägt war dies unter 21% Sauerstoff unter normalem Medium. Unter 21% Sauerstoff und 3OHB fand sich ein leicht schwächeres Signal. Unter 5% Sauerstoff konnte ein leicht stärkeres Signal unter 3OHB im Vergleich zu normalem Medium beobachtet werden. Bei 1% Sauerstoff waren kein Unterschied unter 3OHB zu erkennen.

3 Ergebnisse

BT-20:

Die Zelllinie exprimiert mRNA des SGLT₁-Rezeptors unter der Kombination von 5% Sauerstoff und Zugabe von 3OHB, sowie unter 1% Sauerstoff und Zugabe von 3OHB. Unter den anderen Bedingungen konnte keine Expression festgestellt werden.

Bei der Analyse der Expression der SGLT₂ mRNA konnte auf Höhe der Bande der Positivkontrolle Niere keine weitere Bande beobachtet werden. Dies galt sowohl für die PCR unter Standardbedingungen, sowie für die PCR, welche mit zuvor an-konzentrierter cDNA ausgeführt wurde.

Es zeigte sich bei der Untersuchung der mRNA Expression des SGLT₁ Rezeptors, dass die drei Zelllinien eine unterschiedliche Expression des Rezeptors aufwiesen. Die mRNA Expression des SGLT₂ Rezeptors war für alle drei Zelllinien negativ. Es fand keine Expression sowohl unter normalem Medium, sowie Medium versetzt mit 3OHB statt, als auch unter keiner der Sauerstoffbedingungen. Zur Überprüfung der fehlenden Expression des SGLT₂ Rezeptors wurde eine Standard PCR durchgeführt, mit 5-facher cDNA Menge wiederholt, die cDNA vor PCR Durchführung gefällt, sowie RNA, welche anschließend in cDNA umgeschrieben wurde aus 6 Well Zellkulturplatten gewonnen und mit dieser eine PCR durchgeführt. In allen Versuchen konnte keine mRNA-Expression des SGLT₂- Rezeptors beobachtet werden.

3.5 Hypoxienachweis mit Hilfe von Carbonic Anhydrase IX (CA IX)

Durch den Westernblot sollte bestätigt werden, dass die Zellen sich unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen befunden haben. Hierfür wurde der Hypoxiemarker CA IX gewählt, welcher in Tumorzellen unter Hypoxie vermehrt exprimiert wird. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Proteingewinnung diente der Nachweis von β -Aktin. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

3 Ergebnisse

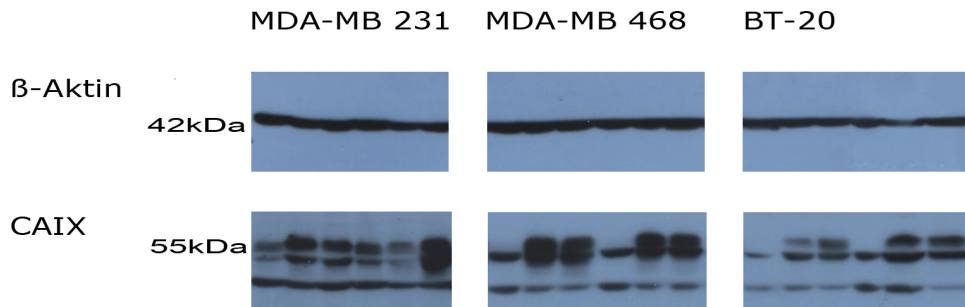


Abbildung 8: Nachweis von β -Aktin und CAIX im Westernblot. Aufgetragen von links nach rechts: MDA-MB 231 (21%, 5%, 1% Sauerstoff, 21%, 5%, 1% Sauerstoff mit Zusatz von 3OHB); MDA-MB 468; BT-20 (unter denselben Bedingungen aufgetragen wie MDA-MB 231).

Es zeigt sich für alle drei Zelllinien, unter allen Bedingungen, eine β -Aktin Expression und somit eine erfolgreiche Proteingewinnung und auch, dass die Spuren mit nahezu gleicher Proteinmenge beladen waren.

In allen drei Zelllinien zeigte sich eine stärkere Expression des Proteins CA IX unter niedrigen Sauerstoffbedingungen von 5% und 1%. Dies konnte sowohl mit normalem Medium, sowie bei Zusatz von 3OHB beobachtet werden und bestätigte somit die, an den Hypoxiebänken eingestellten, niedrigen Sauerstoffkonzentrationen.

Bei der Zelllinie MDA-MB 231 fand sich bei 5% Sauerstoff und Zusatz von 3OHB ein schwächeres Ergebnis im Vergleich zu 21% Sauerstoff und Zusatz von 3OHB. Eine weitere Diskrepanz dieser Art konnte nicht beobachtet werden. Ein möglicher Grund für dieses singulär abweichende Ergebnis könnte hier möglicherweise eine geringere Proteinbeladung der Bande sein.

3.6 Chemosensitivitätstestung

Die Cytostatikaversuche dienten dazu herauszufinden, ob durch Zugabe von 3OHB die Behandlung der Zelllinien mit Cytostatika, wie sie üblicherweise in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt werden, beeinflusst wird. Hierfür wurden die Zellen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen angezüchtet und mit den Cytostatika Epirubicin, Paclitaxel und Carboplatin in steigenden Konzentrationen behandelt. Das verbleibende Zellwachstum wurde mit Hilfe des Brdu-Tests quantifiziert und als prozentuales Wachstum angegeben. Als Referenzwert (entsprechend 100%)

3 Ergebnisse

diente wiederum der Mittelwert der optischen Dichte aus den Kontrollansätzen, welche nicht mit Cytostatika behandelt wurden. (siehe Material und Methoden 2.5. Chemosensitivitätstest). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 9 - 11 zusammengefasst.

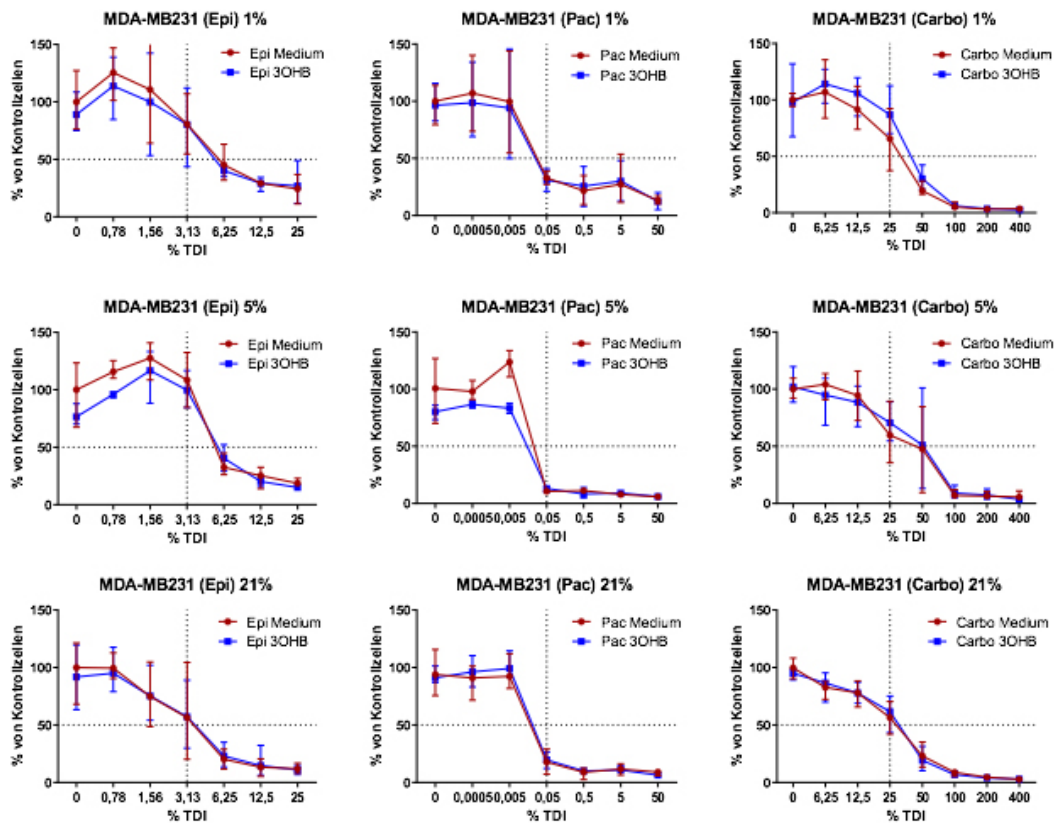


Abbildung 9: Wachstumskurven der Zelllinie MDA-MB 231 für die Cytostatika: Epirubicin, Paclitaxel, Carboplatin mit und ohne Einfluss von 3OHB unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21,5% und 1%. Aufgetragen relatives Wachstum in % gegen prozentuale TDI.

MDA-MB 231:

Insgesamt zeigte sich in der Zelllinie kein Unterschied zwischen der Kontrolle und unter Zugabe von 3OHB im Ansprechen auf die zugegebenen Cytostatika. Auffällig war, dass es unter Epirubicin bei 1% und 5% Sauerstoff zunächst zu einem Anstieg des Zellwachstums kam, bevor dieses mit höheren Cytostatika-Dosis wieder abfiel. Des Weiteren wurde die Zelllinie weniger stark von Carboplatin im Zellwachstum gehemmt, als die beiden anderen Zelllinien. Die Epirubicin-Konzentrationen, bei

3 Ergebnisse

denen die Zellproliferation auf die Hälfte abgefallen war (IC 50) ist für verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen mit und ohne 3OHB in Tabelle 5 dargestellt.

IC 50 Epirubicin [$\mu\text{g/ml}$]	1% O ₂	5% O ₂	21% O ₂
G5-Medium	0,045	0,048	0,017
3OHB-Medium	0,04	0,04	0,017

Tabelle 5: IC 50-Werte unter Epirubicin für MDA-MB 231

Bei Paclitaxel konnte sowohl für die Zellen unter normalem Medium, sowie unter 3OHB zunächst ein Plateau im prozentuaem Wachstum beobachtet werden. Mit höheren Paclitaxelkonzentrationen von über 0,005% TDC nahm das Zellwachstum schnell ab. Die Kurven für das G5-Medium sowie für das Medium mit 3OHB verliefen parallel, eine Beeinflussung durch 3OHB war nicht erkennbar. Tabelle 6 zeigt die IC 50-Werte für Paclitaxel bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen.

IC 50 Paclitaxel [$\mu\text{g/ml}$]	1% O ₂	5% O ₂	21% O ₂
G5-Medium	0,0051	0,004	0,0026
3OHB-Medium	0,0045	0,002	0,003

Tabelle 6: IC 50-Werte unter Paclitaxel für MDA-MB 231

Bei Carboplatin kam es unter 1% Sauerstoff initial bei geringerer Cytostatika-Konzentration zu einer Separation der Kurven mit einer nominell höheren Zellproliferation bei Zugabe von 3OHB. Bei sich weiterhin überlappenden Standardabweichungen wurde dieser Unterschied als nicht signifikant eingestuft. Bei 5% und 21% Sauerstoff zeigte sich kein Unterschied im Zellwachstum unter 3OHB, die Kurven verliefen nahezu identisch. Tabelle 7 zeigt die IC 50-Werte für Carboplatin bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen.

IC 50 Carboplatin [$\mu\text{g/ml}$]	1% O ₂	5% O ₂	21% O ₂
G5-Medium	5	6	3,9
3OHB-Medium	7,2	6,6	3,9

Tabelle 7: IC 50-Werte unter Carboplatin für MDA-MB 231

3 Ergebnisse

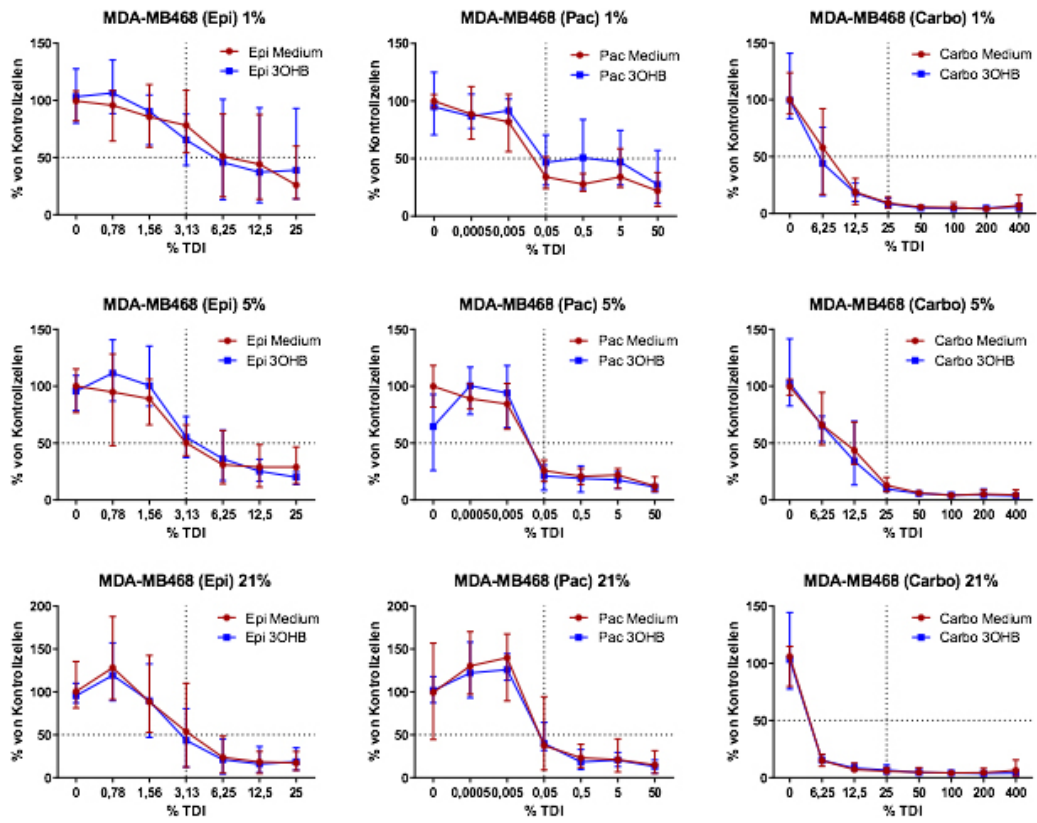


Abbildung 10: Wachstumskurven der Zelllinie MDA-MB 468 für die Cytostatika: Epirubicin, Paclitaxel, Carboplatin mit und ohne Einfluss von 3OHB unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21,5% und 1%. Aufgetragen relatives Wachstum in % gegen prozentuale TDI.

MDA-MB 468:

Auch bei dieser Zelllinie ließ sich kein Unterschied zwischen normalem Medium und Medium versetzt mit 3OHB feststellen. Im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien reagierte die Zelllinie sensibler auf Carboplatin mit einer stärkeren Abnahme des Zellwachstums. Unter Epirubicin kam es bei den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen zu einem kontinuierlichen Abfall der Zellproliferation. Die Kurven für G₅- und 3OHB überkreuzten sich teilweise, blieben jedoch immer innerhalb der Standardabweichung. Tabelle 8 zeigt die IC₅₀-Werte für Epirubicin bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen.

3 Ergebnisse

IC 50 Epirubicin [$\mu\text{g/ml}$]	1% O ₂	5% O ₂	21% O ₂
G5-Medium	0,044	0,025	0,023
3OHB-Medium	0,041	0,029	0,02

Tabelle 8: IC 50-Werte unter Epirubicin für MDA-MB 468

Bei Paclitaxel sah man bei geringen Zytostatika-Konzentrationen zunächst eine Plateaubildung, gefolgt von einem raschen Abfall der Proliferation. Dieses Muster war bei allen Sauerstoff-Konzentrationen erkennbar. Tabelle 9 zeigt die IC 50-Werte für Paclitaxel bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen.

IC 50 Paclitaxel [$\mu\text{g/ml}$]	1% O ₂	5% O ₂	21% O ₂
G5-Medium	0,004	0,003	0,008
3OHB-Medium	0,0062	0,003	0,0077

Tabelle 9: IC 50-Werte unter Paclitaxel für MDA-MB 468

Bei der Zellreihe MDA-MB 468 konnte unter Carboplatin eine rasche Abnahme des Zellwachstums sowohl unter normalem Medium als auch unter 3OHB beobachtet werden. Der zytotoxische Effekt von Carboplatin war am ausgeprägtesten bei einer Sauerstoff-Konzentration von 21%. Tabelle 10 zeigt die IC 50-Werte für Carboplatin bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen.

IC 50 Carboplatin [$\mu\text{g/ml}$]	1% O ₂	5% O ₂	21% O ₂
G5-Medium	0,8	1,3	0,26
3OHB-Medium	0,6	1,1	0,26

Tabelle 10: IC 50-Werte unter Carboplatin für MDA-MB 468

3 Ergebnisse

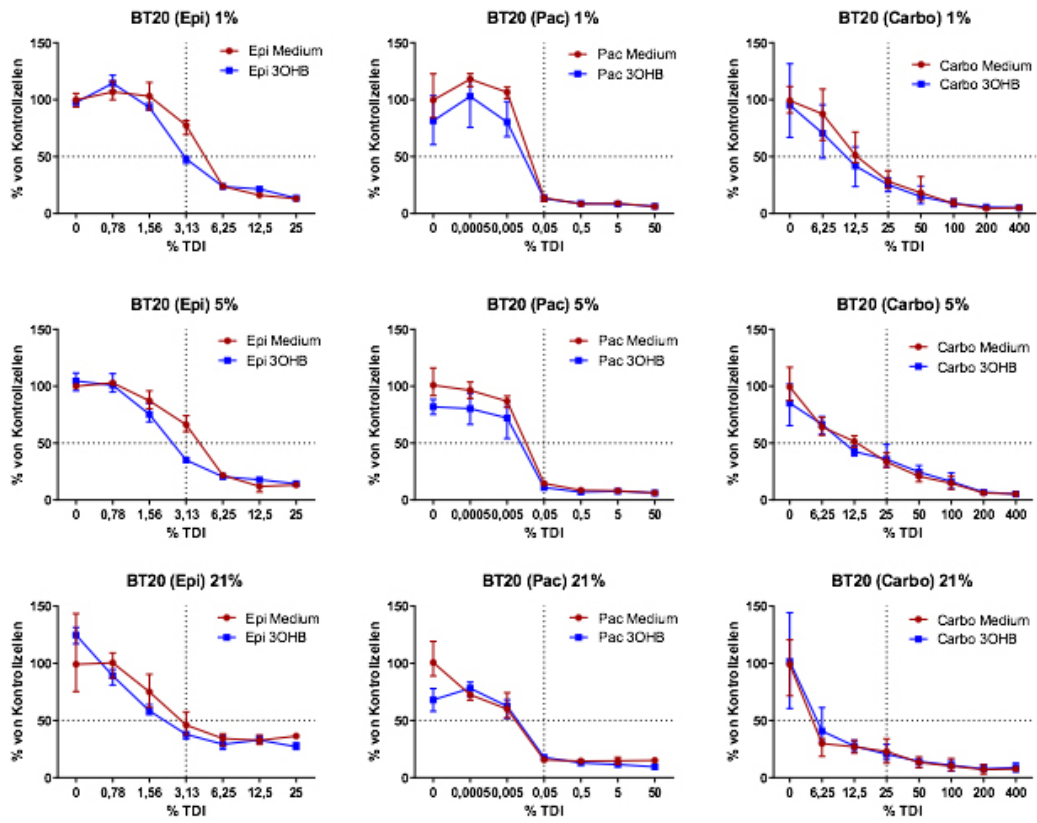


Abbildung 11: Wachstumskurven der Zelllinie BT-20 für die Cytostatika: Epirubicin, Paclitaxel, Carboplatin mit und ohne Einfluss von 3OHB unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21,5% und 1%. Aufgetragen relatives Wachstum in % gegen prozentuale TDI.

BT-20:

Zusammenfassend ließ sich auch bei der Zelllinie BT-20 kein relevanter Unterschied zwischen Kontrollzellen und Zellen unter 3OHB Einfluss finden, die Kurven verliefen zum Großteil innerhalb der Standardabweichung parallel. Eine Ausnahme hiervon war die Proliferationsrate unter Epirubicin im mittleren Dosisbereich (TDC von 1,56 - 6,25). Hier kam es unter 3OHB zu erhöhten Toxizität von Epirubicin. Dieser Effekt war bei allen Sauerstoff-Konzentrationen erkennbar. Tabelle 11 zeigt die IC 50-Werte für Epirubicin bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen.

3 Ergebnisse

IC 50 Epirubicin [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	1% O ₂	5% O ₂	21% O ₂
G5-Medium	0,045	0,048	0,024
3OHB-Medium	0,022	0,022	0,016

Tabelle 11: IC 50-Werte unter Epirubicin für BT-20

Bei Paclitaxel kam es im niedrigen Dosisbereich unter Hypoxie zu einer verminderten Proliferationsrate bei Zusatz von 3OHB. Unter höheren Paclitaxel-Konzentrationen nahm das Wachstum in beiden Nährmedien rasch ab. Bei 21% Sauerstoff liefen die Kurven unter beiden Bedingungen nahezu identisch. Tabelle 12 zeigt die IC 50-Werte für Paclitaxel bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen.

IC 50 Paclitaxel [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	1% O ₂	5% O ₂	21% O ₂
G5-Medium	0,003	0,002	0,0009
3OHB-Medium	0,002	0,0013	0,001

Tabelle 12: IC 50-Werte unter Paclitaxel für BT-20

Bei Carboplatin verliefen die Kurven unter beiden Bedingungen nahezu identisch. Unter 21% Sauerstoff kam es unter beiden Bedingungen zu einer deutlich schnelleren Abnahme des Zellwachstums als unter den beiden hypoxischen Bedingungen. Tabelle 13 zeigt die IC 50-Werte für Carboplatin bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen.

IC 50 Carboplatin [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	1% O ₂	5% O ₂	21% O ₂
G5-Medium	2,3	2,02	0,66
3OHB-Medium	1,6	1,95	0,83

Tabelle 13: IC 50-Werte unter Carboplatin für BT-20

Zusammenfassend lässt sich beobachten, dass es, abgesehen von kleineren Schwankungen, zu keiner Beeinflussung von 3OHB auf das Zellwachstum unter Cytostatikabehandlung kam. Die Zelllinien wurden von den Cytostatika unterschiedlich stark in ihrem Wachstum beeinflusst. So reagierte die Zelllinie MDA-MB 468 bereits unter niedrigeren Konzentrationen von Carboplatin mit einer stärkeren Abnahme des Zellwachstums, im Vergleich zu der Zelllinie MDA-MB231 und BT-20. Sie war also deutlich Platin-sensitiver als die beiden anderen Zelllinien. Des Weiteren ließen

3 Ergebnisse

sich Unterschiede unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen beobachten. Abgesehen von einzelnen Werten war bei höheren Sauerstoffkonzentrationen eine geringere Zytostatika-Dosis nötig, um den selben zytotoxischen Effekt zu erzielen. Dies ließ sich für alle Zelllinien sowohl unter normalem Medium, sowie unter 3OHB Einfluss beobachten und deckt sich gut mit den bekannten Daten, dass Tumoren unter Hypoxie deutlich Chemotherapie-resistenter sind als unter ausreichender Oxygenierung (68).

3.7 Bestrahlungsversuche

In den Bestrahlungsversuchen sollte der Einfluss von 3OHB auf die Proliferation bestrahlter Zellen untersucht werden. Hierfür wurden die Zelllinien unter normalem Medium und Medium versetzt mit 3OHB von 0 bis 8Gray bestrahlt. Die Auswertung erfolgte mittels Kristallviolett-Test (KV Test) und WST8 Test. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 12 - 14 zusammengefasst.

3 Ergebnisse

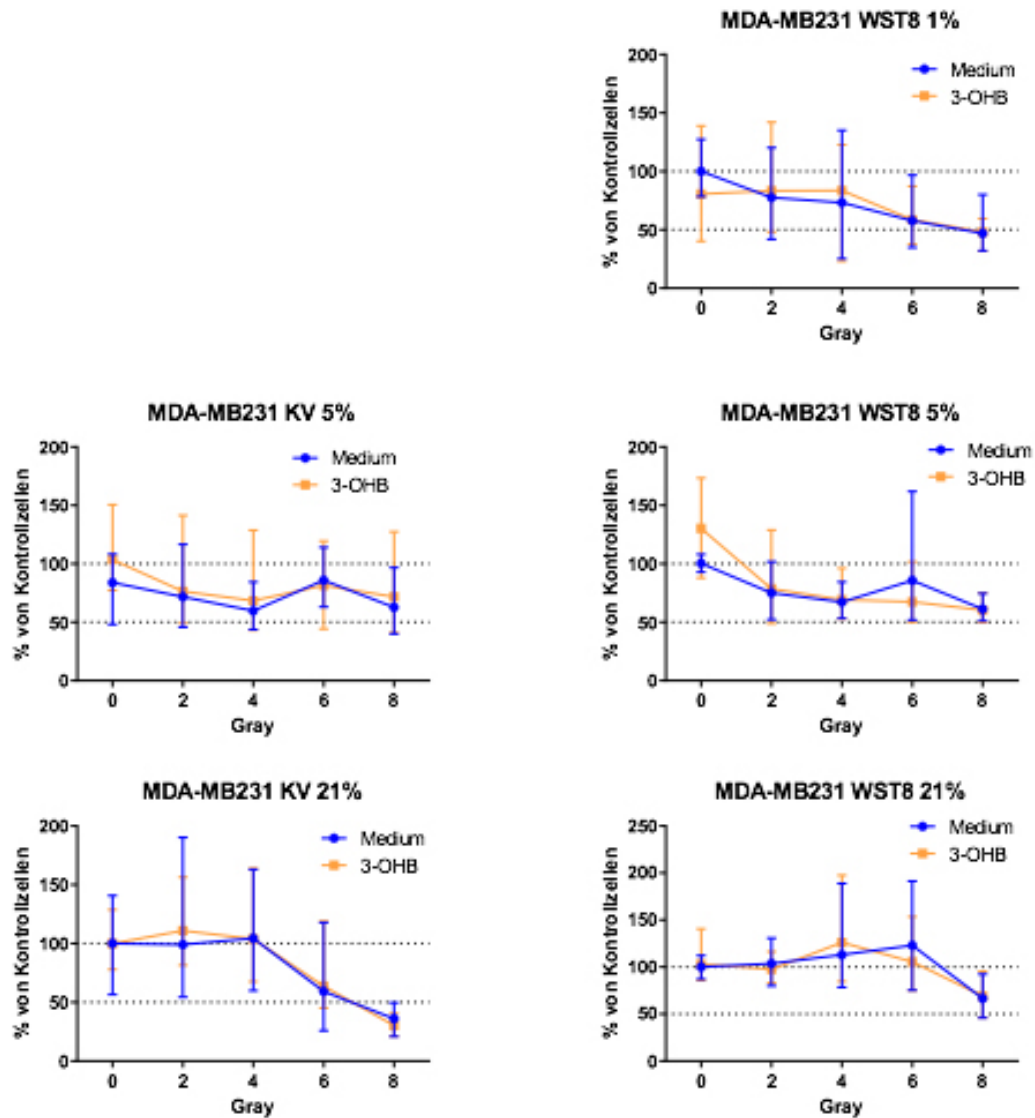


Abbildung 12: Proliferationstest der Zelllinie MDA-MB 231 im Vergleich normales Medium mit Medium versetzt mit 3OHB, unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21%, 5% und 1% Sauerstoff, Bestrahlung von 0 bis 8 Gray, Proliferationsnachweis mittels KV-Test und WST-8. Aufgetragen prozentuale Anzahl Kolonien / Proliferation gegen Bestrahlungsdosis in Gray.

MDA-MB 231:

Allgemein zeigten sich bei dieser Zelllinie teilweise unterschiedliche Ergebnisse zwischen den beiden Testverfahren KV-Test und WST8. Die Ergebnisse unter 1% Sauerstoff im KV Test wurde aufgrund stark abweichender Standardabweichungen

3 Ergebnisse

mit der Gefahr einer Ergebnisverfälschung aus der Graphik und der Auswertung entnommen. Im Gegensatz hierzu konnte im WST8 Test unter normalem Medium und 1% Sauerstoff eine konstante Abnahme der Zellproliferation bei steigender Bestrahlungsdosis beobachten werden. Unter 3OHB kam es erst unter Bestrahlungsdosen über 4Gray zu einer Abnahme der Zellproliferation, wobei sich die Standardabweichungen der beiden Kurven überschneiden.

Bei 5% Sauerstoff konnte man im KV Test sowohl unter normalem Medium als auch unter 3OHB zunächst eine Abnahme der angewachsenen Zellkolonien bis zu einer Bestrahlungsdosis von 4Gray beobachten. Unter 6Gray kam es bei beiden Bedingungen wieder zu einem Anstieg des Signals, welches bei 8Gray wieder absank. Im WST8 Test konnte unter beiden Bedingungen eine kontinuierliche Abnahme der Zellproliferation unter steigender Bestrahlung festgestellt werden. Von 0 zu 2Gray konnte ein steiler Abfall, im weiteren Verlauf eine langsamere Abnahme der Proliferation beobachtet werden.

Bei 21% Sauerstoff zeigte sich bis zu einer Bestrahlungsdosis von 4Gray unter beiden Bedingungen keine wesentliche Ab- oder Zunahme des Zellwachstums. Die Standardabweichungen beider Kurven überschneiden sich hierbei. Unter höheren Bestrahlungsdosen kam es unter beiden Bedingungen zu einer Abnahme der angewachsenen Kolonien. Im WST8 Test konnte unter beiden Bedingungen eine konstante Proliferation bis 4Gray beobachtet werden. Unter den höheren Bestrahlungsdosen nahm diese für beide Bedingungen leicht ab, wobei auch eine sehr hohe Standardabweichung der Messwerte festzustellen war.

3 Ergebnisse

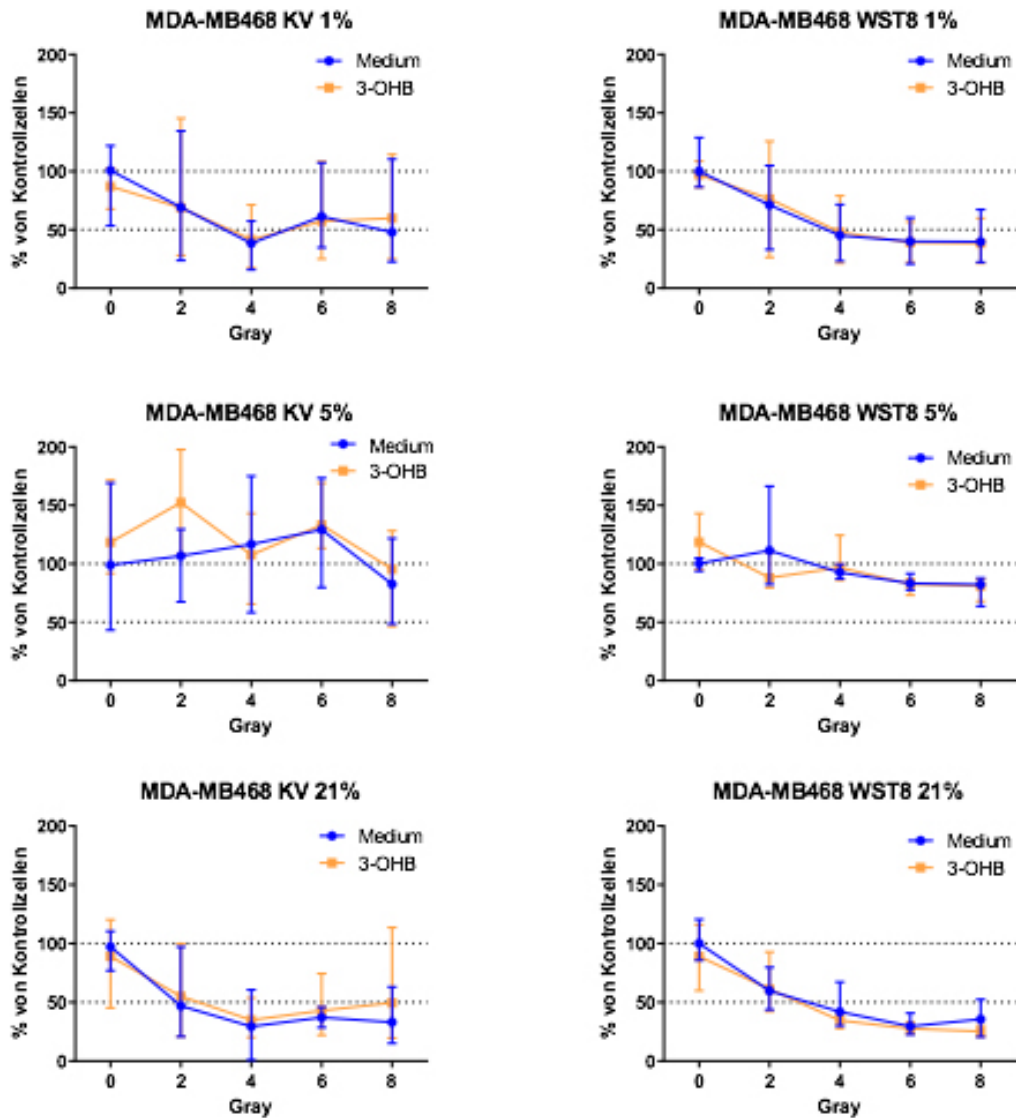


Abbildung 13: Proliferationstest der Zelllinie MDA-MB 468 im Vergleich normales Medium mit Medium versetzt mit 3OHB, unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21%, 5% und 1% Sauerstoff, Bestrahlung von 0 bis 8 Gray, Proliferationsnachweis mittels KV-Test und WST-8. Aufgetragen prozentuale Anzahl Kolonien / Proliferation gegen Bestrahlungsdosis in Gray.

MDA-MB 468:

Insgesamt zeigte die Zelllinie unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen ein unterschiedliches Ansprechen auf die Bestrahlung. Während es bei 1% und 21% Sauerstoff in beiden Nährmedien zu einer Abnahme des Zellwachstums unter höheren

3 Ergebnisse

Bestrahlungsdosen kam, blieb das Zellwachstum bei 5% Sauerstoff unter Bestrahlung relativ stabil. Im KV Test kam es unter niedrigen Bestrahlungsdosen sogar zu einer Zunahme des Zellwachstums.

Unter 1% Sauerstoff konnte im KV Test unter normalem Medium, sowie Medium versetzt mit 3OHB eine Abnahme der Zellkolonien bis 4Gray beobachtet werden. Im Anschluss kam es unter beiden Bedingungen zu keiner weiteren Abnahme, sondern verblieb bis auf leichte Schwankungen auf gleicher Höhe. Im WST 8 Test zeigte sich ebenfalls bei 1% Sauerstoff unter beiden Bedingungen eine Abnahme der Proliferation bis 4Gray, welche im Anschluss ein Plateau erreicht.

Bei 5% Sauerstoff konnte man im KV Test unter normalem Medium eine langsame Zunahme der Zellkolonien bis 6Gray und anschließender steiler Abnahme unter 8Gray beobachten. Unter 3OHB Einfluss nahmen die Kolonien bei 2Gray zu und sanken anschließend wieder ab, wobei es zu keiner Abnahme unter 100% kam. Die Standardabweichungen beider Kurven überschneiden sich hierbei. Unter 5% Sauerstoff zeigt sich im WST8 Test sowohl unter normalem Medium, als auch unter 3OHB, eine langsame Abnahme der Proliferation der Zellen unter höheren Bestrahlungsdosen. Auch hier zeigten beide Testverfahren nicht gleiche Ergebnisse.

Bei 21% Sauerstoff überkreuzten sich die Kurven des KV Tests für normales Medium und Medium versetzt mit 3OHB mehrmals. Unter normalem Medium kam es zu einer starken Abnahme der Kolonien unter 2Gray und zu keiner nennenswerten weiteren Abnahme im weiteren Verlauf. Unter 3OHB sanken die Kolonien bis 4Gray, im Anschluss konnte man einen leichten Anstieg unter höheren Bestrahlungsdosen beobachten, wobei diese unter 50% verblieben. Im WST8 Test kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Zellproliferation bei Zunahme der Bestrahlungsdosen, unter beiden Mediumsbedingungen fast identischen Ausmaßes.

3 Ergebnisse

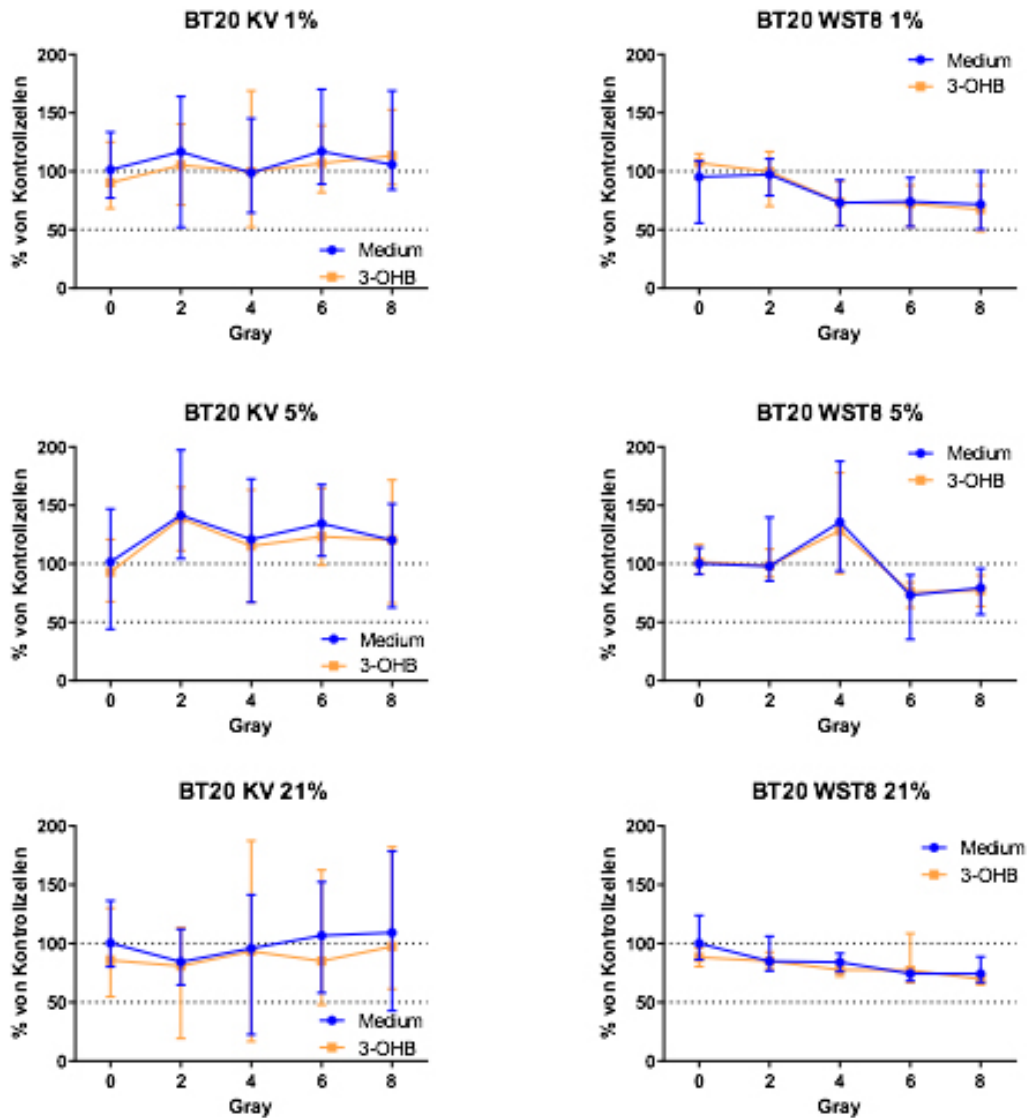


Abbildung 14: Proliferationstest der Zelllinie BT-20 im Vergleich normales Medium mit Medium versetzt mit 3OHB, unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21%, 5% und 1% Sauerstoff, Bestrahlung von 0 bis 8 Gray, Proliferationsnachweis mittels KV-Test und WST-8. Aufgetragen prozentuale Anzahl Kolonien / Proliferation gegen Bestrahlungsdosis in Gray.

BT-20:

Generell scheinen die BT-20 Zellen recht resistent gegenüber der Bestrahlung zu sein, denn das Zellwachstum war sowohl im Nachweissystem des KV-Tests als auch mittels WST-8 Test relativ stabil bzw. zeigte nur eine geringe Veränderung

3 Ergebnisse

gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Bei 1% Sauerstoff zeigte sich im KV Test für beide Bedingungen konstante Werte der adhärenen Zellkolonien für alle Bestrahlungsdosen. Im WST8 Test kam es zwischen 2 und 4 Gray zu einer Abnahme des Zellwachstums, welches im Anschluss nur langsam weiter abnimmt. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen normalem Medium und Medium versetzt mit 3OHB.

Bei 5% Sauerstoff konnte man im KV Test keine Abnahme der Zellkolonien beobachten, es kam sogar unter beiden Bedingungen unter Bestrahlung zu einem Anstieg. Im WST8 Test kommt es bei 4 Gray zu einem Anstieg der Zellproliferation, welcher im Anschluss unter höheren Bestrahlungsdosen wieder abfällt. Die Kurven der beiden Bedingungen verliefen hierbei nahezu identisch.

Bei 21% zeigte sich unter beiden Bedingungen ein abwechselndes Ab- und Aufsteigen der Kurven. Hierbei verläuft die Kurve unter 3OHB leicht unter der des normalen Medium, allerdings überschneiden sich die Standardabweichungen beider Kurven. Im WST8 Test konnte eine langsame aber stetige Abnahme der Proliferation unter Zunahme der Bestrahlungsdosis unter beiden Bedingungen beobachtet werden.

Insgesamt konnte kein Unterschied zwischen normalem Medium und Medium versetzt mit 3OHB in den Bestrahlungsversuchen festgestellt werden. Teilweise kam es zu unerwarteten Kurvenverläufen, wie beispielsweise der Zunahme der Kolonien sowie der Proliferation unter höheren Bestrahlungsdosen.

4 Diskussion

Triple-negative Brustkrebszellen (TNBC) bilden eine Untergruppe der Brustkrebszellen, welche insbesondere bei jungen Frauen auftreten. Diese stellen sich klinisch aggressiv dar und weisen dementsprechend eine schlechte Prognose auf (3). Sie sind assoziiert mit einer erhöhten Rate lokaler Rezidive, vermehrter Invasivität und Fernmetastasen (69-72). Neue Behandlungsstrategien zur Verbesserung der Prognose sind Gegenstand aktueller Forschung (73). Eine mögliche Ergänzung zur konventionellen Therapie stellt hierbei die ketogene Diät dar. Durch diese Ernährungsform kommt es zu einem Anstieg der Ketonkörper im Blut, wobei als Hauptketonkörper β -Hydroxybutyrat (3OHB) freigesetzt wird (22,23). Dieser steht in der Diskussion Einfluss auf das Tumorwachstum nehmen zu können. Das Hauptresultat dieser Arbeit ist, dass in vitro unter dem Einfluss des unter ketogener Diät erhöhten 3OHB kein wachstumshemmender oder wachstumsfördernder Einfluss auf die getesteten triple-negativen Brustkrebszellen messbar war. Durch 3OHB wurde die Wirkung einer gleichzeitig durchgeführten Zytostatikabehandlung bzw. Strahlenexposition ebenfalls weder abgeschwächt noch verstärkt.

Es wurde versucht, die Bedingungen der Zellkulturen den physiologischen Konditionen weitgehend anzugleichen. Die Sauerstoffkonzentrationen unterliegen in Tumoren einer gewissen Schwankungsbreite. Meist zeigen sich im peripheren und Brustkrebs-Gewebe hypoxische Bedingungen (40,41). Aus diesem Grund fiel die Wahl neben der für Laborversuche üblichen Sauerstoffkonzentration von 21% auf die physiologischeren O₂-Werte von 5 % und 1%.

Vergleichende Wachstumsversuche wurden durchgeführt, um den Einfluss von 3OHB auf die Zellproliferation zu untersuchen. Hierfür wurde ein BrDu- Test, sowie ein colony- formation assay durchgeführt. Mit dem colony- formation assay konnte eine Langzeitkontrolle des Zellwachstums über mehrere Tage hinweg durchgeführt werden. Nachteilig bei dieser Methode ist die lediglich visuelle Ergebnisbeobachtung und die daraus resultierende qualitative Einschätzung – welche naturgemäß keine

4 Diskussion

exakte Anzahl und Quantifizierung zulässt. Außerdem besteht die Notwendigkeit adhärenter Zellen. Vitale oder proliferierende Zellen, welche sich von der Zellkulturschale abgelöst haben, können nicht erfasst werden (112).

Im Gegensatz dazu kann mit dem BrDU-Test die Proliferationsmenge präzise quantifiziert werden. BrDU wird bei proliferierenden Zellen in die DNA aufgenommen und durch den Einsatz von Antikörpern sichtbar gemacht. Hierdurch kann die Menge des BrDUs bestimmt und Schlussfolgerungen über das Proliferationsverhalten gezogen werden. Ein Nachteil dieser Methode besteht allerdings darin, dass es sich um eine zeitlich begrenzte Observation handelt. Es kann lediglich eine Aussage über das Wachstumsverhalten der letzten 24 Stunden getroffen werden. Auch können hierbei nur proliferierende Zellen ermittelt werden. Vitale Zellen, die sich nicht im Teilungsprozess befinden, werden nicht erfasst (113). In beiden vergleichenden Wachstumsversuchen konnte kein Unterschied der Zellproliferation zwischen der Kontrollgruppe und den Zellen mit Zusatz von 3OHB beobachtet werden.

Unterschiede im Zellwachstum zeigten sich lediglich im colony-formation assay bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen. Die Zelllinien MDA-MB 231 und MDA-MB 468 zeigten ihr intensivstes Zellwachstum unter 21% Sauerstoff, die Zelllinie BT-20 hingegen unter hypoxischen Bedingungen von 5% und 1% Sauerstoff. Ursache für das unterschiedliche Wachstumsverhalten könnte ein zunehmender Selektionsdruck unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen sein. Mehrfach wurde eine Zunahme der genetischen Instabilität unter Hypoxie beobachtet, die bisweilen zu aggressiveren Tumorvarianten führen kann (114). So setzten sich die Tumorzellen durch, welche sich genetisch am besten an diese hypoxischen Bedingungen anpassen können. Dies gilt gleichermaßen auch für Brustkrebszellen (74). In Untersuchungen zur genetischen Beeinflussung von Brustkrebszellen unter Hypoxie reagierten diese überraschend unterschiedlich. Es zeigten sich Unterschiede, die auf den Rezeptorstatus zurückzuführen waren, aber auch die Tumorzellen untereinander verhielten sich in ihrer Genexpression unter Hypoxie recht heterogen (74).

Es ist daher möglich, dass sich BT 20 genotypisch besser hypoxischen Bedingungen anpassen kann und hierdurch ein verstärktes Wachstum zeigt – oder es unter Sauerstoffmangel zu einer vermehrten malignen Entartung dieser Zellreihe kam.

Einige Arbeiten beobachten einen allgemein negativen Effekt von Ketonkörpern auf das Tumorwachstum. So soll es unter Anwesenheit hoher Mengen ebendieser zu einer Wachstumsförderung kommen und eventuell sogar aggressivere Tumorzellen

4 Diskussion

len entstehen können (48,49,75,76). Hierbei wurden allerdings unphysiologisch hohe Dosen von 10 mmol/l β -OHB in den Zellkulturversuchen bzw. 500mg/kg β -OHB intraperitoneal bei Versuchen an Mäusen appliziert, welche unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Körper nicht realisierbar wären. Zusätzlich waren durch Genmanipulation Zellen teilweise in der Lage, Ketonkörper selbst herzustellen. Die Höhe der hierdurch entstehenden β -OHB Konzentration wurde des weiteren nicht quantifiziert. Es bleibt hierdurch die Frage offen, ob ein möglicher protumoröser Effekt auf die Genmanipulation selbst zurück zu führen ist, oder ob die Wachstumsförderung mit der Höhe und Konzentration von β -OHB korreliert.

Die meisten einschlägigen Studien berichten allerdings nicht über derartige Effekte. Mehrfach wurde hingegen eine positive, wachstumshemmende Wirkung durch ketogene Diät beobachtet (77-82). Die begleitenden Versuche wurden hierbei hauptsächlich *in vitro* an Zellkulturen (79, 82) und *in vivo* an Mäusen (79-82) durchgeführt. Klinische Studien am Menschen sind nicht sonderlich zahlreich (77). Gemeinsam ist diesen zumeist klinischen Einzelfallstudien, dass eine ketogene Diät unterstützend zu einer etablierten Therapie durchgeführt wurde. Im Rahmen eines solchen multimodalen Therapiekonzeptes könnte die ketogene Diät einen weiteren bemerkenswerten Aspekt im Zusammenwirken mit Phosphoinositid-3 (PI3K)-Inhibitoren darstellen (83). Im Tiermodell zeigte die ketogene Diät alleine keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Tumorzellen. Eine Kombinationstherapie aus ketogener Diät und PI3K Inhibitoren (83) hingegen führte zu grundlegend anderen Ergebnissen. PI3K führt über Signalwege zu einer Förderung des Zellwachstums und ist bei Tumorerkrankungen häufig mutiert (84). Eine Hemmung dieses Signalwegs könnte somit zu einer Verlangsamung bzw. Sistierung des Tumorprogresses führen. Der Einsatz eines PI3K Inhibitors führt häufig zu einem Anstieg des Blutglukosespiegels (85). Es wird gemeinhin angenommen, dass durch den Glukoseanstieg Insulin ausgeschüttet wird, welches wiederum zu einer Aktivierung des PI3K Signalwegs führt und somit den wachstumshemmenden Effekt der Medikation vermindert. Die Arbeit konnte zeigen, dass durch ketogene Diät der Blutglukose- und Insulinspiegel reduziert wurde und hierdurch wahrscheinlich der wachstumshemmende Effekt des PI3K Inhibitors gefördert wurde. Hierbei erwies sich die ketogene Diät effektiver als Metformin und ein SGLT2 Inhibitor. Bezüglich der Brustkrebszellen zeigte sich besonders in den rezeptorpositiven Tumorzellen eine Mutation und Hochregulierung des PIK3-Wegs mit erstem Ansprechen in klinischen Studien (115).

4 Diskussion

Eine weitere Möglichkeit im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes Einfluss auf das Tumorgeschehen nehmen zu können, stellen eventuell die SGLT2 Inhibitoren dar. Bei SGLT1 und SGLT2 handelt es sich um Glukosetransporter. SGLT2-Inhibitoren werden aktuell zur Behandlung von Patienten mit Diabetes mellitus sowie zur Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzt. In den Fokus der Tumorforschung sind sie durch die Erkenntnis geraten, dass einige Tumorzellen SGLT1- und SGLT2-Rezeptoren ebenfalls exprimieren oder überexprimieren (86). Tumore haben einen erhöhten Glukosebedarf und eine Hemmung der SGLT-Rezeptoren könnte somit im Rahmen einer Therapie unterstützend wirken bzw. die Tumorprogression verlangsamen. Erste Experimente an Mäusen konnten Hinweise auf einen solchen Effekt zeigen (87,120). Wir untersuchten deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Expression der SGLT1- und SGLT2- Rezeptoren auf verschiedenen Tumor-zelllinien unter unterschiedlichen Sauerstoff-Konzentrationen sowie einen möglichen Einfluß von 3 OHB in Abhängigkeit vom SGLT-Rezeptorstatus. Hier fanden sich deutliche Unterschiede der SGLT1 - Expression auf den verschiedenenTumorzelllinien. Bei MDA-MB 231 fand keine Expression statt. Für MDA-MB 468 konnte eine starke Expression vor allem unter 21% Sauerstoff und normalem Medium beobachtet werden. Es fand sich ein leicht abgeschwächtes Signal unter 3OHB. Bei BT-20 konnte nur unter Bedingungen von 5% Sauerstoff und Zugabe von 3OHB sowie 1% Sauerstoff und 3OHB eine Expression festgestellt werden. Eine Expression von SGLT2 konnte für keine der drei Zelllinien gezeigt werden. Die anschließend untersuchte Fragestellung bestand darin, ob eine ketogene Diät mit niedrigen Glukosekonzentrationen bei Überexpression der SGLT-Rezeptoren Einfluss auf das Tumorwachstum nehmen könnte. In den Laborversuchen konnte weder ein wachstumsfördernder noch ein wachstumshemmender Effekt durch 3OHB festgestellt werden – unabhängig vom SGLT-Status. Die untersuchten Zelllinien zeigten unter allen Bedingungen keine Expression des SGLT-2 Rezeptors. Eine Beeinflussung des Stoffwechsels durch SGLT-2-Blocker wurde zwar nicht untersucht. Jedoch erscheint hier ein Effekt bei fehlender Rezeptor-Expression unwahrscheinlich.

„Short term fasting“, also dem Fasten für eine kurze Zeit, wird ein positiver Effekt in Kombination mit einer Chemotherapie zugeschrieben (88-91). Einige Studien zeigen in vitro, dass hierbei vor und während einer Chemotherapie eine geringere Zytotoxizität des Chemotherapeutikums auf gesunde Zellen beobachtet werden kann. Auch entartete Tumorzellen sollen stärker angegriffen werden (88, 89). Erste klei-

4 Diskussion

nerer Studien mit Patienten wurden bereits durchgeführt (90,91).

Während des Fastens steigen die Konzentrationen von 3-OHB im Blut messbar an. Deshalb sollte untersucht werden, ob 3-OHB (als Hauptmetabolit während einer Fastenperiode) für die positiv beschriebenen Effekte des „Kurzzeitfastens“ auf das Tumorwachstum unter Chemotherapie verantwortlich sein kann. Hierfür wurden die triple negativen Brustkrebs-Zellen mit Carboplatin, Paclitaxel und Epirubicin in steigender Dosierung behandelt. In diesen durchgeführten Chemosensitivitätstestungen konnten keine Unterschiede zwischen Zellen mit bzw. ohne 3-OHB-Zusatz festgestellt werden. Es fanden sich ebenso keine signifikanten Unterschiede im Zellwachstum der beiden Gruppen und somit keine „Sensitivierung“ der Brustkrebszellen unter 3-OHB. Erste klinische Studien, die sich mit den Auswirkungen einer ketogenen Diät während einer Chemotherapie befassen, untersuchen aktuell vorrangig die Verträglichkeit einer solchen Diät. Bezüglich eines tumorwachstumshemmenden Effektes kann aktuell keine valide Aussage getroffen werden, da es sich faktisch um Einzelstudien mit geringen Fallzahlen handelt – und diese meist nicht in standardisierter, randomisierter Weise durchgeführt worden sind. (50,51,116,117) Unterschiede auf das Ansprechen einer Zytostatikabehandlung zeigten sich bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen. So konnte unter niedriger Sauerstoffkonzentrationen eine Abnahme der Chemosensitivität festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass niedrige Sauerstoffkonzentrationen zu einer Abnahme der Zellproliferation führen können. Unter extrem niedrigen Sauerstoffkonzentrationen kann es außerdem sogar zu einem vollständigen Arrest des Zellzyklus kommen (92). Die meisten Chemotherapeutika haben eine größere Wirkung auf proliferierende als auf ruhende (nicht zellzyklusaktive) Zellen (93). Auch Mitochondrien werden unter Hypoxie in ihrer Aktivität herunterreguliert und sind hierdurch als Zielstruktur weniger empfindlich (94). Es wird vermutet, dass Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen durch mitochondriale Veränderungen eine erhöhte Konzentration an freien Sauerstoffradikalen aufweisen (118). Durch erhöhte Glukoseaufnahme und somit gesteigerte Produktion von NADPH wird außerdem angenommen, dass Tumorzellen hiermit diesen oxidativen Stress zu kompensieren versuchen. Im Umkehrschluss würde das bedeuten, dass durch das mittels ketogener Diät induzierte reduzierte Glukoseangebot die Tumorzellen einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt wären (118). So könnte jene verminderte mitochondriale Aktivität unter Hypoxie ebenfalls eine verminderte Zytotoxizität erklären.

4 Diskussion

Einen anderen Ansatzpunkt stellt die vermehrte genetische Instabilität unter Hypoxie dar (95). Ebenso kommt es durch Aktivierung mehrerer Signalwege zu einer erhöhten Resistenz der Tumorzellen (96). Hypoxie-induzierter Faktor-1alpha (HIF-1a) führt über Hochregulierung von vascular endothelial growth factor (VEGF) zu einer erhöhten Angiogenese und Invasivität. Vermittelt durch epidermal growth factor (EGF) und insulin-like growth factor 2 (IGF-2) kommt es zu einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen. Auch eine Anpassung an die veränderten metabolischen Anforderungen durch eine erhöhte Glukoseaufnahme ist zu beobachten (96). Somit ist wahrscheinlich durch Aktivierung vielfältiger Mechanismen in den Tumorzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapien festzustellen.

Ein weiterer zentraler Baustein der Tumorbehandlung ist die Strahlentherapie. Die Vulnerabilität von Zellen auf Bestrahlung ist abhängig von Reoxyginierung, DNA-Reperatur, Radiosensitivität, Redistribution im Zellzyklus und Repopulation (den sogenannten „fünf Rs“) (102). Eine ketogene Diät kann auf diese Faktoren unterschiedlich Einfluss nehmen. Der Wirkmechanismus der Strahlentherapie besteht darin, dass durch ionisierende Strahlung freie Sauerstoffradikale entstehen, die wiederum zu Schäden und hierdurch zur Apoptose der betroffenen Zellen führt. Durch Erhöhung des Sauerstoffangebots könnte es dementsprechend zu einer vermehrten Bildung freier Sauerstoffradikale kommen und somit zu einer erhöhten Wirksamkeit der Behandlung. In präklinischen Studien kam es zu einer Normalisierung der Tumor-Vaskularisation unter einer ketogener Diät, durch welche die Tumoroxygenierung verbessert werden könnte (102). Unter ketogener Diät wurde eine Hemmung von DNA-Reperaturmechanismen beobachtet, die zu einer verstärkten Wirksamkeit der Bestrahlung führen könnte (102). Weitere Angriffspunkte könnten in der Verminderung der Kompensationsmöglichkeiten gegen oxidativen Stress liegen sowie ein durch ketogene Diät generell verzögertes Tumorwachstum (verzögerte Repopulation). Diese Ernährungsform könnte somit durch Beeinflussung vielfältiger Signalwege positiv Einfluss auf die Bestrahlungssensitivität von Tumorzellen nehmen.

In den durchgeführten Bestrahlungsversuchen konnte analog den Ergebnissen der Chemosensitivitätstests kein Unterschied in Bezug auf Proliferation bzw. Zellvitalität von Tumorzellen in normalem und in mit 3OHB versetztem Medium festgestellt werden. Allerdings fanden sich große Standardabweichungen in den Kurvenverläufen und bisweilen divergierende Ergebnisse nach Kristallviolett-Test bzw. WST-8 Test. Das wiederum könnte dadurch verursacht worden sein, dass im Kristallviolett-Test

4 Diskussion

nur die Menge adhärenter Zellen nach mehreren Waschschrinen durch Anfärben ermittelt wird, eine direkte Aussage über die Zellvitalität jedoch nicht getroffen werden kann. Ebenso können hiermit vitale, aber abgelöste Zellen, nicht erfasst werden. Ein solches Ablösen der Zellen konnte im Rahmen des Färbeprozesses des KV Tests festgestellt werden. Dies war insbesondere bei der Zelllinie MDA-MB 231 unter 1% Sauerstoff der Fall. Vermutlich kam es hier zu einem schlechten Anwachsen der Zellen unter der niedrigen Sauerstoffkonzentrationen. Insgesamt zeigte sich im KV Test nur ein schwaches Signal. Durch das geringe Signal wiederum stellten sich auch kleinere messbare Abweichungen als große Ausschläge in der relativen Zellproliferation dar, was wiederum zu großen Standardabweichungen führte. Retrospektiv scheint deshalb der WST8-Test grundsätzlich geeigneter zu sein, valide Aussagen über die Zellproliferation in den Bestrahlungsversuchen zu tätigen. Das WST-8 wird hierbei zu Formazan in der laufenden Zellkultur verstoffwechselt. Diese Umwandlung kann von vitalen Zellen durchgeführt werden und erfasst adhärente und abgelöste Zellen gleichermaßen. Dieser Test liefert somit präzisere Aussagen über die Zellvitalität und -menge.

Dass eine ketogene Ernährung einen positiven Einfluss bei einer Bestrahlungstherapie haben kann, wurde in einigen Studien mit Mäusen gezeigt (103, 104, 105). In diesen Arbeiten wurde neben den in vivo Versuchen auch ein in vitro Versuch mit einer Kombination aus Ketonkörpern und Bestrahlung durchgeführt (103). Analog zu unseren Ergebnissen fand sich hier ebenfalls keine Auswirkung durch Einsatzes von Ketonkörper alleine auf die Strahlensensibilität in vitro. In vivo allerdings zeigte sich ein verzögertes Tumorwachstum unter ketogener Diät und durchgeführter Bestrahlung. Eine andere Studie zeigt, dass eine Bestrahlung in vitro und in vivo nicht zwangsläufig zum gleichen Ergebnis führen muss (106). Hier wurde eine unterschiedliche Strahlensensitivität in vitro und in vivo beobachtet. Somit ist es durchaus denkbar, dass die komplexen Vorgänge in vivo mit zahlreichen sich gegenseitig beeinflussenden Signalkaskaden in vitro nicht hinreichend abgebildet werden können. Belastbare klinische Studien, welche sich mit den Auswirkungen der ketogenen Diät unter Bestrahlung bei Menschen befassen, finden sich nur wenige. Zwei Studien führten bei einer verhältnismäßig kleinen Gruppe von Probanden eine ketogene Diät parallel zu einer Bestrahlungs- bzw. Chemotherapie durch (107, 108). In Bezug auf Verträglichkeit unter diesem Ernährungsparadigma sind die Ergebnisse divergent. Eine Einschätzung hinsichtlich der Wirkung auf Tumorprogredienz

4 Diskussion

war auf Grund der beschriebenen geringen Teilnehmerzahl ebenfalls nicht abschließend möglich. Eine Klärung dieser Fragestellungen macht in Zukunft größere und randomisierte Studien notwendig.

Durch die durchgeführten Therapien, sowie durch die Tumorerkrankung selbst, kommt es bei vielen Patienten zu einer sogenannten Tumor-Kachexie. Hierunter versteht man einen starken ungewollten Gewichtsverlust, mit einhergehendem Verlust von Muskelmasse und Fett. Dies führt nachweislich zu einer reduzierten Lebensqualität (97). Im Mausmodell wurde schon früh beobachtet, dass fettreiche Ernährung dem typischen Gewichts- und Muskelmassenverlust aktiv entgegenwirkt und somit zu weniger stark ausgeprägter Kachexie bei Tumorerkrankungen führen kann (98, 99, 100). Ein positiver Effekt durch eine Nahrungsergänzung mit Omega-3-Fettsäuren auf das Gewicht und den Appetit bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium wurde in einigen klinische Studien beschreiben (101). In diesem Zusammenhang könnte eine ketogene Diät mit entsprechend hohem Fettanteil eine Reduktion der Tumorkachexie unterstützen und wäre infolgedessen eine sinnvolle Ergänzung zur klassischen Therapie. Zusammenfassend lässt sich jedoch in dieser Arbeit bei in-vitro Versuchen mit triple negativen Brustkrebszellen kein Effekt von 3 OHB auf das Proliferationsverhalten unter verschiedenen Bedingungen feststellen.

5 Zusammenfassung

Das triple negative Mamma-Karzinom stellt eine Tumorart dar, welche besonders junge Frauen betrifft und eine schlechte Prognose aufweist. Unterstützende und prognoseverbessernde Therapien sind deshalb Gegenstand aktueller Forschung. Eine mögliche unterstützende Therapie stellt hierbei die ketogene Diät dar. Diese Arbeit untersuchte die Fragestellung, ob β -Hydroxybutyrat (3OHB), welches als Hauptmetabolit unter ketogener Diät oder beim Fasten erhöht ist, Einfluss auf das Zellwachstum triple-negativer Brustkrebszellen ausübt. Außerdem wurde eruiert, ob 3OHB die üblichen Behandlungsformen - Chemotherapie und Strahlentherapie - positiv oder negativ beeinflusst. In vitro wurden Versuche mit drei triple-negativen Brustkrebszellreihen unter möglichst physiologischen Bedingungen durchgeführt. Hierbei konnte durch 3OHB weder ein wachstumsfördernder noch ein wachstumshemmender Effekt beobachtet werden. Genauso zeigte sich bei den Chemo- oder Strahlentherapieversuchen keine durch 3OHB induzierte Wechselwirkung. In vivo durchgeführte Studien über den Einfluss einer ketogenen Diät finden sich nur vereinzelt. Um belastbare Daten zu erhalten werden deshalb weitere Studien in Zukunft vonnöten sein. Eine ketogene Diät könnte hierbei im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes eine unterstützende Rolle spielen, wofür erste Einzelfallstudien Hinweise geben (109).

Literatur

- [1] Deutsche Krebsgesellschaft / DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A: Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA: a cancer journal for clinicians* 2016, 66(1):31-42
- [2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
- [3] Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010 Nov 11;363(20):1938-48.
- [4] Nguyen PL, Taghian AG, Katz MS, Niemierko A, Abi Raad RF, Boon WL, Bellon JR, Wong JS, Smith BL, Harris JR. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol*. 2008 May 10;26(14):2373-8.
- [5] Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1684-91.
- [6] Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, Harris L, Hait W, Toppmeyer D. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5652-7.
- [7] Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Ma-

Literatur

- tese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
- [8] Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Nov;13(11):674-690.
- [9] Karima Oualla et.al. Novel therapeutic strategies in the treatment of triple-negative breast cancer *Ther Adv Med Oncol* 2017, Vol. 9(7) 493-511
- [10] Warburg O, Posener K, Negelein E. 1924. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem Zeitschr*. 152:309-343
- [11] Warburg O, Wind F, Negelein E. 1926. Über den Stoffwechsel der Tumoren im Körper. *Klin Wochenschr*. 5:829-838
- [12] Albert L. Lehninger. Übers, u. bearb. von Diether Neubert u. Ferdinand Hucho. - Grundkurs Biochemie 2., verb. Aufl. - Berlin; New York : de Gruyter, 198, ISBN 3-11-0102210-8; Kapitel 13 Elektronen Transport und oxidative Phosphorylierung
- [13] Dashty M A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism, *Clinical Biochemistry* 46 (2013) 1339-1352
- [14] Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*. 2005 Mar;202(3):654-62.
- [15] Kunkel M, Reichert TE, Benz P, Lehr HA, Jeong JH, Wieand S, Bartenstein P, Wagner W, Whiteside TL. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2003 Feb 15;97(4):1015-24.

Literatur

- [16] Choi NC, Fischman AJ, Niemierko A, Ryu JS, Lynch T, Wain J, Wright C, Fidias P, Mathisen D: Dose-response relationship between probability of pathologic tumor control and glucose metabolic rate measured with FDG PET after preoperative chemoradiotherapy in locally advanced non- small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002, 54:1024-1035
- [17] Cahill GF Jr. Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:1-22.
- [18] Zhou W, Mukherjee P, Kiebish MA, Markis WT, Mantis JG, Seyfried TN. The calorically restricted ketogenic diet, an effective alternative therapy for malignant brain cancer. *Nutr Metab (Lond).* 2007 Feb 21;4:5.
- [19] Chang HT, Olson LK, Schwartz KA. Ketolytic and glycolytic enzymatic expression profiles in malignant gliomas: implication for ketogenic diet therapy. *Nutr Metab (Lond).* 2013 Jul 5;10(1):47.
- [20] Tisdale MJ, Brennan RA. Loss of acetoacetate coenzyme A transferase activity in tumours of peripheral tissues. *Br J Cancer.* 1983 Feb;47(2):293-7.
- [21] Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond).* 2010 Jan 27;7:7.
- [22] Laffel L: Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews* 1999, 15(6):412-426
- [23] Wheless JW, History of ketogenic diet, *Epilepsia* 2008; 49 Suppl 8: 3-5
- [24] Payne N.E. et al, the ketogenic and related diet in adolescents and adults, *Epilepsia*, 52(11):1941-1948, 2011
- [25] The Charlie Foundation. What is the Ketogenic Diet? The Charlie Foundation; 2014. <https://www.charlifoundation.org/explore-ketogenic-diet/explore-1/introducing-the-diet>. Accessed on 15 September 2015

Literatur

- [26] Yue Qiao, Zhaohua Gao et al. Breath Ketone Testing: A New Bio- marker for Diagnosis and Therapeutic Monitoring of Diabetic Ketosis Bio-Med Research International Volume 2014, Article ID 869186
- [27] Pan JW, Rothman TL, Behar KL, Stein DT, Hetherington HP: Human brain beta-hydroxybutyrate and lactate increase in fasting-induced ketosis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2000, 20(10):1502-1507
- [28] Cahill GF Jr. Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:1-22.
- [29] Louis M. Sherwood, Edith E. Parris, Starvation in man *NEJM* 1970 Vol. 282 No.12; 282:668-675
- [30] Kim DY, Rho JM: The ketogenic diet and epilepsy. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2008, 11(2):113-120
- [31] D'Andrea Meira I, Romão TT, Pires do Prado HJ, Krüger LT, Pires MEP, da Conceição PO. Ketogenic Diet and Epilepsy: What We Know So Far. *Front Neurosci.* 2019 Jan 29;13:5.
- [32] Stryer Biochemie, 7.Auflage, Berlin, Springer Spektrum 2013, Kapitel 22 S.660-663 ISBN: 9783827429896
- [33] A.F. Branco et al. Ketogenic diets: from cancer to mitochondrial diseases and beyond *European Journal of Clinical Investigation* Vol 46 (3): 285–298
- [34] Cahill GF Jr, Veech RL. Ketoacids? Good medicine? *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2003;114:149-61
- [35] Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 1989 Dec 1;49(23):6449-65.
- [36] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* (2012) 148(3):399–408.

Literatur

- [37] Saskia E. Rademakers, Paul N. Span et al. Molecular aspects of tumour hypoxia, *molecular oncology* 2 (2008) 41–53
- [38] Potter CP, Harris AL. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *Br J Cancer*. 2003 Jul 7;89(1):2-7.
- [39] Vaupel P, Hockel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal* (2007) 9(8):1221–35.
- [40] McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol*. 2014 Mar;87(1035):20130676.
- [41] Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Höckel M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res*. 1991 Jun 15;51(12):3316-22.
- [42] Stafford P, Abdelwahab MG, Kim DY, Preul MC, Rho JM, Scheck AC. The ketogenic diet reverses gene expression patterns and reduces reactive oxygen species levels when used as an adjuvant therapy for glioma. *Nutr Metab (Lond)*. 2010 Sep 10;7:74.
- [43] Otto C, Kaemmerer U, Illert B, Muehling B, Pfetzer N, Wittig R, Voelker HU, Thiede A, Coy JF. Growth of human gastric cancer cells in nude mice is delayed by a ketogenic diet supplemented with omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides. *BMC Cancer*. 2008 Apr 30;8:122.
- [44] Lv M, Zhu X, Wang H, Wang F, Guan W. Roles of caloric restriction, ketogenic diet and intermittent fasting during initiation, progression and metastasis of cancer in animal models: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Dec 11;9(12):e115147.
- [45] Poff AM, Ari C, Seyfried TN, D'Agostino DP. The ketogenic diet and hyperbaric oxygen therapy prolong survival in mice with systemic metastatic cancer. *PLoS One*. 2013 Jun 5;8(6):e65522.

Literatur

- [46] Abdelwahab MG, Fenton KE, Preul MC, Rho JM, Lynch A, Stafford P, Scheck AC. The ketogenic diet is an effective adjuvant to radiation therapy for the treatment of malignant glioma. *PLoS One*. 2012;7(5):e36197.
- [47] Maurer GD, Brucker DP, Bähr O, Harter PN, Hattingen E, Walenta S, Mueller-Klieser W, Steinbach JP, Rieger J. Differential utilization of ketone bodies by neurons and glioma cell lines: a rationale for ketogenic diet as experimental glioma therapy. *BMC Cancer*. 2011 Jul 26;11:315.
- [48] Gloria Bonuccelli, Aristotelis Tsirigos, Diana Whitaker-Menezes, Stephanos Pavlides, Richard G. Pestell, Barbara Chiavarina, Philippe G. Frank, Neal Flomenberg, Anthony Howell, Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, Federica Sotgia and Michael P. Lisanti Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis, Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism *Cell Cycle* September 1, 2010 9:17, 3506-3514
- [49] Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, Marco Prisco, Adam Ertel, Aristotelis Tsirigos, Zhao Lin, Stephanos Pavlides, Chengwang Wang, Neal Flomenberg, Erik S. Knudsen, Anthony Howell, Richard G. Pestell, Federica Sotgia and Michael P. Lisanti Ketones and lactate increase cancer cell “stemness”, driving recurrence, metastasis and poor clinical outcome in breast cancer Achieving personalized medicine via metabolo-genomics, *Cell Cycle* 2011;10(8):1271-1286
- [50] Nebeling LC, Miraldi F, Shurin SB, Lerner E. Effects of a ketogenic diet on tumor metabolism and nutritional status in pediatric oncology patients: two case reports. *J Am Coll Nutr*. 1995 Apr;14(2):202-8.
- [51] Zuccoli G, Marcello N, Pisanello A, Servadei F, Vaccaro S, Mukherjee P, Seyfried TN. Metabolic management of glioblastoma multiforme using standard therapy together with a restricted ketogenic diet: Case Report. *Nutr Metab (Lond)*. 2010 Apr 22;7:33.
- [52] M. Schmidt, N. Pfetzer, M. Schwab, I. Strauss, U. Kämmerer, Effects

Literatur

- of a ketogenic diet on the quality of life in 16 patients with advanced cancer: a pilot trial, *Nutrition & Metabolism* 8 (1) (2011).
- [53] Tan-Shalaby JL, Carrick J, Edinger K, Genovese D, Liman AD, Passero VA, Shah RB. Erratum to: Modified Atkins diet in advanced malignancies-final results of a safety and feasibility trial within the Veterans Affairs Pittsburgh Healthcare System. *Nutr Metab (Lond)*. 2016 Sep 1;13(1):61.
- [54] Klement RF, Richard D.; Gross, Elena C., Champ, Colon E.; D'Agostino, Dominic P.; Fine, Eugene J.; Kämmerer, Ulrike; Poff, Angela; Rho, Jong M.; Seyfried, Thomas N.; Scheck, Adrienne C.: Need for new review of article on ketogenic dietary regimes for cancer patients. *Medical Oncology* 2017, 34(6):1-4
- [55] Schwartz et al. Treatment of glioma patients with ketogenic diets: report of two cases treated with an IRB-approved energy-restricted ketogenic diet protocol and review of the literature *Cancer & Metabolism* (2015) 3:3
- [56] Hae-Yun Chung, Yoo Kyoung Park , Rationale, Feasibility and Acceptability of Ketogenic Diet for Cancer Treatment , *journal of cancer prevention* Vol. 22, No. 3, September 2017 *J Cancer Prev* 2017;22:127-134
- [57] Paoli A, Bianco A, Grimaldi KA, Lodi A, Bosco G. Long term successful weight loss with a combination biphasic ketogenic Mediterranean diet and Mediterranean diet maintenance protocol. *Nutrients*. 2013 Dec 18;5(12):5205-17.
- [58] Paoli A, Cenci L, Grimaldi KA. Effect of ketogenic Mediterranean diet with phytoextracts and low carbohydrates/high-protein meals on weight, cardiovascular risk factors, body composition and diet compliance in Italian council employees. *Nutr J*. 2011 Oct 12;10:112.
- [59] Zajac A, Poprzecki S, Maszczyk A, Czuba M, Michalczyk M, Zydek G. The effects of a ketogenic diet on exercise metabolism and physical performance in off-road cyclists. *Nutrients*. 2014 Jun 27;6(7):2493-508.

Literatur

- [60] Urbain P, Strom L, Morawski L, Wehrle A, Deibert P, Bertz H. Impact of a 6-week non-energy-restricted ketogenic diet on physical fitness, body composition and biochemical parameters in healthy adults. *Nutr Metab (Lond)*. 2017 Feb 20;14:17.
- [61] UDashti HM, Mathew TC, Hussein T, Asfar SK, Behbahani A, Khoussheed MA, Al-Sayer HM, Bo-Abbas YY, Al-Zaid NS. Long-term effects of a ketogenic diet in obese patients. *Exp Clin Cardiol*. 2004 Fall;9(3):200-5. PMID: 19641727; PMCID: PMC2716748.
- [62] UPérez-Guisado J, Muñoz-Serrano A, Alonso-Moraga A. Spanish Ketogenic Mediterranean Diet: a healthy cardiovascular diet for weight loss. *Nutr J*. 2008 Oct 26;7:30.
- [63] US₃-Leitlinie Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Version 4.0 – Dezember 2017 AWMF Register- nummer: 032-045OL
- [64] UChang J, Lee A, Lee J, Lim W, Sung SH, Moon BI. Correlation between the molecular subtype of breast cancer and the in vitro adenosine triphosphate- based chemosensitivity assay. *J Korean Surg Soc*. 2013;84:313-20
- [65] ULin Y, Lv F, Liu F, Guo X, Fan Y, Gu F, Gu J, Fu L. High Expression of Pyruvate Kinase M2 is Associated with Chemosensitivity to Epirubicin and 5-Fluorouracil in Breast Cancer. *J Cancer*. 2015 Sep 15;6(11):1130-9.
- [66] UKurbacher CM, Mallmann P, Kurbacher JA, Hübner H, Krebs D. Chemosensibilitätstestungen in der gynäkologischen Onkologie: Erfahrungen mit einem ATP-Biolumineszenzassay. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1996;56:70-8.
- [67] UGwe Ahn S, Ah Lee S, Woo Lee H, Min Lee H, Jeong J. In vitro chemoresponse assay based on the intrinsic subtypes in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2014;44:624-31

Literatur

- [68] UCosse J-P, Michiels C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anti-cancer Agents Med Chem* (2008) 8(7):790-7.
- [69] UNguyen PL, Taghian AG, Katz MS, Niemierko A, Abi Raad RF, Boon WL, Bellon JR, Wong JS, Smith BL, Harris JR. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol.* 2008 May 10;26(14):2373-8.
- [70] UVoduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol.* 2010 Apr 1;28(10):1684-91.
- [71] Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, Harris L, Hait W, Toppmeyer D. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006 Dec 20;24(36):5652-7.
- [72] ørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
- [73] Bergin ART, Loi S. Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Res.* 2019 Aug 2;8:F1000 Faculty Rev-1342.
- [74] Hedenfalk IG, Naomi; Kronblad, Asa; veerla, Srinivas; Ringnér, Markus; Langberg, Göran: Microarray-Based Analyses of Hypoxia-Induced Transcriptional Changes in Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Genomics & Proteomics* 2005, 2:83-96
- [75] Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Lisanti MP, Sotgia F. Ketone bodies and two-compartment tumor metabolism: stromal ketone production fuels mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells. *Cell Cycle.* 2012 Nov 1;11(21):3956-63.

Literatur

- [76] Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell Cycle*. 2012 Nov 1;11(21):3964-71.
- [77] Fine EJ, Segal-Isaacson CJ, Feinman RD, Herszkopf S, Romano MC, Tomuta N, et al. Targeting insulin inhibition as a metabolic therapy in advanced cancer: a pilot safety and feasibility dietary trial in 10 patients. *Nutrition* 2012;28:1028–35
- [78] Klement RJ, Kämmerer U. Is there a role for carbohydrate restriction in the treatment and prevention of cancer? *Nutr Metab (Lond)*. 2011 Oct 26;8:75.
- [79] Gluschnaider U, Hertz R, Ohayon S, Smeir E, Smets M, Pikarsky E, Bar-Tana J. Long-chain fatty acid analogues suppress breast tumorigenesis and progression. *Cancer Res*. 2014 Dec 1;74(23):6991-7002.
- [80] Freedland, S.J., Mavropoulos, J., Wang, A., Darshan, M., Demark-Wahnefried, W., Aronson, W.J., et al., Carbohydrate restriction, prostate cancer growth, and the insulin-like growth factor axis. *The Prostate* 2008 68:11e19.
- [81] Nakamura, K., Tonouchi, H., Sasayama, A., Ashida, K. A ketogenic formula prevents tumor progression and cancer cachexia by attenuating systemic inflammation in colon 26 tumor-bearing mice. *Nutrients* 2018, 10, 206
- [82] Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP. Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *J Immunol*. 2013 Aug 1;191(3):1486-95.
- [83] Hopkins BD, Pauli C, Du X, Wang DG, Li X, Wu D, Amadiume SC, Goncalves MD, Hodakoski C, Lundquist MR, Bareja R, Ma Y, Harris EM, Sboner A, Beltran H, Rubin MA, Mukherjee S, Cantley LC. Suppression of insulin feedback enhances the efficacy of PI3K inhibitors. *Nature*. 2018 Aug;560(7719):499-503.

Literatur

- [84] Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013 Oct 17;502(7471):333-339.
- [85] Bendell JC, Rodon J, Burris HA, de Jonge M, Verweij J, Birle D, Demanase D, De Buck SS, Ru QC, Peters M, Goldbrunner M, Baselga J. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2012 Jan 20;30(3):282-90.
- [86] Madunić IV, Madunić J, Breljak D, Karaica D, Sabolić I. Sodium-glucose cotransporters: new targets of cancer therapy? *Arh Hig Rada Toksikol*. 2018 Dec 1;69(4):278-285.
- [87] Scafoglio C, Hirayama BA, Kepe V, Liu J, Ghezzi C, Satyamurthy N, Moatamed NA, Huang J, Koepsell H, Barrio JR, Wright EM. Functional expression of sodium-glucose transporters in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 28;112(30):E4111-9.
- [88] Lee C, Raffaghello L, Brandhorst S, Safdie FM, Bianchi G, Martin-Montalvo A, Pistoia V, Wei M, Hwang S, Merlino A, Emionite L, de Cabo R, Longo VD. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Sci Transl Med*. 2012 Mar 7;4(124):124ra27.
- [89] Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, Longo VD. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 17;105(24):8215-20.
- [90] Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab*. 2014 Feb 4;19(2):181-92.
- [91] Safdie FM, Dorff T, Quinn D, Fontana L, Wei M, Lee C, Cohen P, Longo VD. Fasting and cancer treatment in humans: A case series report. *Aging (Albany NY)*. 2009 Dec 31;1(12):988-1007.

Literatur

- [92] Pires IM, Bencokova Z, Milani M, et al. Effects of acute versus chronic hypoxia on DNA damage responses and genomic instability. *Cancer Res* 2010; 70: 925–35
- [93] Tannock I. Cell kinetics and chemotherapy: a critical review. *Cancer Treat Rep.* 1978 Aug;62(8):1117-33.
- [94] ing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, Shu Y. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Cancer.* 2019 Nov 11;18(1):157.
- [95] Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 1996 Dec 15;56(24):5754-7.
- [96] Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist.* 2004;9 Suppl 5:10-7.
- [97] Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin.* 2002 Mar-Apr;52(2):72-91.
- [98] Beck SA, Tisdale MJ. Nitrogen excretion in cancer cachexia and its modification by a high fat diet in mice. *Cancer Res.* 1989 Jul 15;49(14):3800-4.
- [99] Tisdale MJ, Brennan RA, Fearon KC. Reduction of weight loss and tumour size in a cachexia model by a high fat diet. *Br J Cancer.* 1987 Jul;56(1):39-43.
- [100] Shukla SK, Gebregiworgis T, Purohit V, Chaika NV, Gunda V, Radhakrishnan P, Mehla K, Pipinos II, Powers R, Yu F, Singh PK. Metabolic reprogramming induced by ketone bodies diminishes pancreatic cancer cachexia. *Cancer Metab.* 2014 Sep 1;2:18.
- [101] Colomer R, Moreno-Nogueira JM, García-Luna PP, García-Peris P, García-de-Lorenzo A, Zarazaga A, Quecedo L, del Llano J, Usán L, Casimiro C. N-3 fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature. *Br J Nutr.* 2007 May;97(5):823-31.

Literatur

- [102] Klement RJ. The influence of ketogenic therapy on the 5 R's of radiobiology. *Int J Radiat Biol.* 2019 Apr;95(4):394-407.
- [103] Allen BG, Bhatia SK, Buatti JM, Brandt KE, Lindholm KE, Button AM, Szweda LI, Smith BJ, Spitz DR, Fath MA. Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemo-therapy responses in lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res.* 2013 Jul 15;19(14):3905-13.
- [104] Abdelwahab MG, Fenton KE, Preul MC, Rho JM, Lynch A, Stafford P, Scheck AC. The ketogenic diet is an effective adjuvant to radiation therapy for the treatment of malignant glioma. *PLoS One.* 2012;7(5):e36197.
- [105] Zahra A, Fath MA, Opat E, Mapuskar KA, Bhatia SK, Ma DC, Rodman SN III, Snyders TP, Chenard CA, Eichenberger-Gilmore JM, Bodeker KL, Ahmann L, Smith BJ, Vollstedt SA, Brown HA, Hejleh TA, Clamon GH, Berg DJ, Szweda LI, Spitz DR, Buatti JM, Allen BG. Consuming a Ketogenic Diet while Receiving Radiation and Chemotherapy for Locally Advanced Lung Cancer and Pancreatic Cancer: The University of Iowa Experience of Two Phase 1 Clinical Trials. *Radiat Res.* 2017 Jun;187(6):743-754.
- [106] Malaise EP, Fertil B, Chavaudra N, Guichard M. Distribution of radiation sensitivities for human tumor cells of specific histological types: comparison of in vitro to in vivo data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1986 Apr;12(4):617-24.
- [107] Zahra A, Fath MA, Opat E, Mapuskar KA, Bhatia SK, Ma DC, Rodman SN III, Snyders TP, Chenard CA, Eichenberger-Gilmore JM, Bodeker KL, Ahmann L, Smith BJ, Vollstedt SA, Brown HA, Hejleh TA, Clamon GH, Berg DJ, Szweda LI, Spitz DR, Buatti JM, Allen BG. Consuming a Ketogenic Diet while Receiving Radiation and Chemotherapy for Locally Advanced Lung Cancer and Pancreatic Cancer: The University of Iowa Experience of Two Phase 1 Clinical Trials. *Radiat Res.* 2017 Jun;187(6):743-754.

Literatur

- [108] Klement RJ, Sweeney RA. Impact of a ketogenic diet intervention during radiotherapy on body composition: I. Initial clinical experience with six prospectively studied patients. *BMC Res Notes*. 2016 Mar 5;9:143.
- [109] İyikesici MS, Slocum AK, Slocum A, Berkarda FB, Kalamian M, Seyfried TN. Efficacy of Metabolically Supported Chemotherapy Combined with Ketogenic Diet, Hyperthermia, and Hyperbaric Oxygen Therapy for Stage IV Triple-Negative Breast Cancer. *Cureus*. 2017 Jul 7;9(7):e1445.
- [110] Robertson IJ, Hand F, Kell MR. FDG-PET/CT in the staging of local/regional metastases in breast cancer. *Breast*. 2011 Dec;20(6):491-4.
- [111] Chamchoy K, Pakotiprapha D, Pumirat P, Leartsakulpanich U, Boonyuen U. Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochem*. 2019 Apr 8;20(1):4.
- [112] Crowley LC, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring Survival of Adherent Cells with the Colony-Forming Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016 Aug 1;2016(8).
- [113] Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol*. 2001 Jul;3(3):67-70. PMID: 11488413.
- [114] Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 1996 Dec 15;56(24):5754-7.
- [115] : du Rusquec P, Blonz C, Frenel JS, Campone M. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in estrogen-receptor positive HER2 negative advanced breast cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2020 Jul 28;12:1758835920940939.
- [116] Rieger J, Bähr O, Maurer GD, Hattingen E, Franz K, Brucker D, Walenta S, Kämmerer U, Coy JF, Weller M, Steinbach JP. ERGO: a pilot study of ketogenic diet in recurrent glioblastoma. *Int J Oncol*. 2014 Jun;44(6):1843-52.

Literatur

- [117] Cohen CW, Fontaine KR, Arend RC, Soleymani T, Gower BA. Favorable Effects of a Ketogenic Diet on Physical Function, Perceived Energy, and Food Cravings in Women with Ovarian or Endometrial Cancer: A Randomized, Controlled Trial. *Nutrients*. 2018 Aug 30;10(9):1187.
- [118] Aykin-Burns N, Ahmad IM, Zhu Y, Oberley LW, Spitz DR. Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem J*. 2009 Feb 15;418(1):29-37.
- [119] <https://www.Igcstandards-atcc.org>
- [120] Scafoglio CR, Villegas B, Abdelhady G, Bailey ST, Liu J, Shirali AS, Wallace WD, Magyar CE, Grogan TR, Elashoff D, Walser T, Yanagawa J, Aberle DR, Barrio JR, Dubinett SM, Shackelford DB. Sodium-glucose transporter 2 is a diagnostic and therapeutic target for early-stage lung adenocarcinoma. *Sci Transl Med*. 2018 Nov 14;10(467):eaat5933.

Abkürzungsverzeichnis

TNBC Triple Negative Breast Cancer

OxPhos Oxidative Phosphorylierung

3-OHB D-β-Hydroxybutyrat

BDH1 β-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase

SCOT Succinyl-CoA Ketoazid Coenzym A Transferase

ACAT 1/2 Acetyl-CoA Acetyltransferase

HIF-1a Hypoxie induzierbarer Faktor 1a

CAIX Carbonic-Anhydrase IX

KD Ketogene Diät

KV-Test Kristallviolett- Test

TDI Test Drug Concentration

Abbildungsverzeichnis

1	Plattenbelegung Colony formation assay	12
2	Plattenbelegung Zytostatikaversuche Epirubicin, Paclitaxel. Blau G ₅ , rot/orange Zugabe 3OHB. Vertikal: Prozentuale Konzentration von Epirubicin und Paclitaxel.	17
3	Plattenbelegung Zytostatikaversuche Carboplatin. Blau G ₅ , rot 3OHB Zugabe. Vertikal: Prozentuale Konzentration von Carboplatin.	18
4	Wachstumsvergleich der Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 468 und BT-20 zwischen normalem G ₅ Medium im Vergleich zu Medium versetzt mit 3OHB, unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 1%, 5% und 21%. Box and Whiskers Graphik mit Darstellung des Medianwerts, Interquartilsbereich, oberes und unteres Whisker.	29
5	Wachstumsvergleich der Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 468 und BT-20, angezüchtet unter normalem Medium und Medium versetzt mit 3OHB, sowie unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21%, 5% und 1%. Die Zellen wurden in 48 Well Platten ausgesät.	32
6	Verbrauch der Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 468 und BT-20 von Glucose(mg/dl), Laktat(mmol/l), 3OHB(mmol/l) unter normalem Medium, sowie Medium versetzt mit 3OHB 9 Tage nach Anlage der Zellkultur, unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 1%, 5% und 21%. Die gestrichelte Linie gibt jeweils den Ausgangswert der Metabolite im Zellmedium an.	34

Abbildungsverzeichnis

7	mRNA- Expression von PBDG, SGLT ₁ und SGLT ₂ der Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 468 und BT-20, Darstellung mittels PCR. Aufgetragen von links nach rechts: Standard-Leiter MDA-MB 231: 21% G ₅ ; 21% 3OHB; 5% G ₅ ; 5% 3OHB; 1% G ₅ ; 1% 3OHB, MDA-MB 468, BT 20 in gleicher Weise aufgetragen, Niere als Positivkontrolle für SGLT 2.	37
8	Nachweis von β -Aktin und CAIX im Westernblot. Aufgetragen von links nach rechts: MDA-MB 231 (21%, 5%, 1% Sauerstoff, 21%, 5%, 1% Sauerstoff mit Zusatz von 3OHB); MDA-MB 468; BT-20 (unter denselben Bedingungen aufgetragen wie MDA-MB 231).	39
9	Wachstumskurven der Zelllinie MDA-MB 231 für die Cytostatika: Epirubicin, Paclitaxel, Carboplatin mit und ohne Einfluss von 3OHB unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21,5% und 1%. Aufgetragen relatives Wachstum in % gegen prozentuale TDI.	40
10	Wachstumskurven der Zelllinie MDA-MB 468 für die Cytostatika: Epirubicin, Paclitaxel, Carboplatin mit und ohne Einfluss von 3OHB unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21,5% und 1%. Aufgetragen relatives Wachstum in % gegen prozentuale TDI.	42
11	Wachstumskurven der Zelllinie BT-20 für die Cytostatika: Epirubicin, Paclitaxel, Carboplatin mit und ohne Einfluss von 3OHB unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21,5% und 1%. Aufgetragen relatives Wachstum in % gegen prozentuale TDI.	44
12	Proliferationstest der Zelllinie MDA-MB 231 im Vergleich normales Medium mit Medium versetzt mit 3OHB, unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21%, 5% und 1% Sauerstoff, Bestrahlung von 0 bis 8 Gray, Proliferationsnachweis mittels KV-Test und WST-8. Aufgetragen prozentuale Anzahl Kolonien / Proliferation gegen Bestrahlungsdosis in Gray.	47
13	Proliferationstest der Zelllinie MDA-MB 468 im Vergleich normales Medium mit Medium versetzt mit 3OHB, unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21%, 5% und 1% Sauerstoff, Bestrahlung von 0 bis 8 Gray, Proliferationsnachweis mittels KV-Test und WST-8. Aufgetragen prozentuale Anzahl Kolonien / Proliferation gegen Bestrahlungsdosis in Gray.	49

Abbildungsverzeichnis

14 Proliferationstest der Zelllinie BT-20 im Vergleich normales Medium mit Medium versetzt mit 3OHB, unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen von 21%, 5% und 1% Sauerstoff, Bestrahlung von 0 bis 8 Gray, Proliferationsnachweis mittels KV-Test und WST-8. Aufgetragen prozentuale Anzahl Kolonien / Proliferation gegen Bestrahlungsdosis in Gray. 51

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht Eckdaten PCR Durchführung.	23
2	Übersicht Glukose, Lactat und 3OHB Werte unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen für die Zelllinie MDA-MB 231	35
3	Übersicht Glukose, Lactat und 3OHB Werte unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen für die Zelllinie MDA-MB 468.	35
4	Übersicht Glukose, Lactat und 3OHB Werte unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen für die Zelllinie BT-20.	36
5	IC 50-Werte unter Epirubicin für MDA-MB 231	41
6	IC 50-Werte unter Paclitaxel für MDA-MB 231	41
7	IC 50-Werte unter Carboplatin für MDA-MB 231	41
8	IC 50-Werte unter Epirubicin für MDA-MB 468	43
9	IC 50-Werte unter Paclitaxel für MDA-MB 468	43
10	IC 50-Werte unter Carboplatin für MDA-MB 468	43
11	IC 50-Werte unter Epirubicin für BT-20	45
12	IC 50-Werte unter Paclitaxel für BT-20	45
13	IC 50-Werte unter Carboplatin für BT-20	45

Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter Apl. Prof. Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit sowie für die stets zuverlässige und konstruktive Zusammenarbeit.

Vielen Dank auch an Michaela Kapp für ihre schier unendliche Geduld, uns Doktoranden in die Arbeit im Labor einzuführen.

Danke an meinen Ehemann Sebastian Winkler sowie meinem Bruder Jonas Willingstorfer für die Unterstützung bei der visuellen Umsetzung dieser Doktorarbeit.

Vielen Dank auch an meine Mutter Eva Willingstorfer für all die unterstützenden und aufmunternden Worte über all die Jahre.

Und ich danke meinem Vater PD Dr. Wilko Reents für all die Zeit, die er investiert hat, um mich durch Anregungen in der Vollendung dieser Doktorarbeit zu unterstützen.