

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

Chirurgische Klinik I

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

**Das onkologische Supportivprodukt Avemar:
Untersuchungen zum antiproliferativen und
antimetabolischen Effekt an
humanen gastrointestinalen Tumorzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Theresa Hahlbrock

aus Ellwangen

Würzburg, Juli 2016

Referent: Prof. Dr. rer. nat. C. Otto
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. H. Wajant
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2017

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Behandlungskonzepte in der Onkologie	1
1.2	Der Stoffwechsel von Tumorzellen	2
1.3	Hypoxie und oxidativer Stress	7
1.4	Mechanismen des Zelltods	9
1.5	Das onkologische Supportivprodukt Avemar	11
1.6	Ziele.....	14
2	Fragen	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Kulturmedien und Pufferlösung	16
3.2	Zelllinien, Zellkultur und Zellernte	16
3.3	Reagenzien	17
3.4	Kristallviolett-Assay.....	18
3.5	ATP-Assay.....	21
3.6	Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies.....	22
3.7	Zellzyklus-Analyse mit Durchflusszytometrie (FACS)	23
3.8	Caspase 3/7 Aktivitätsassay	24
3.9	Messung von Reduktionsäquivalenten	25
3.10	Glukose/Laktatmessung	26
3.11	Western-Blot Untersuchungen.....	27
3.12	Statistische Auswertung	27
4	Ergebnisse.....	29
4.1	Bestimmung von Zellvitalität und Untersuchungen zum Zellmeta- bolismus	29
4.2	Charakterisierung der antiproliferativen Effekte von Avemar	36
4.3	Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Avemar	41
4.4	Antiproliferative Effekte von Avemar an Fibroblasten	53
5	Beantwortung der Fragen.....	58
6	Diskussion	60
6.1	Stellenwert der Alternativ-/Komplementärmedizin in der Onkologie	60
6.2	Versuchsdesign und -durchführung.....	61
6.3	Der antiproliferative Effekt von DMBQ und Avemar: Zytotoxizität.....	62
6.4	Der antiproliferative Effekt von Avemar: Zytostase und Wachstums- hemmung.....	66
6.5	Der antiproliferative Effekt von Avemar an nicht-malignen Zellen	69
7	Ausblick	71
8	Zusammenfassung	72
9	Literaturverzeichnis	74
	Eigene Publikationen, Danksagung, Lebenslauf	

1 Einleitung

Im Januar 1971 verkündete der US-amerikanische Präsident Richard Nixon in seiner Rede zur Lage der Nation den Kampf gegen Krebs («War on cancer»). Das erklärte Ziel war, eine Heilungsmöglichkeit für Krebs zu finden (Kalberer JT, 1975). Im Dezember des gleichen Jahres unterzeichnete der Präsident den »National Cancer Act«. Mit diesem Gesetz sollte der Forschung die bestmögliche Unterstützung zugesichert werden, Forschungsergebnisse zügig umzusetzen. Zum Erreichen dieses Ziels wurden seitdem Fördergeldern in Milliardenhöhe bereitgestellt (Cutler DM, 2008).

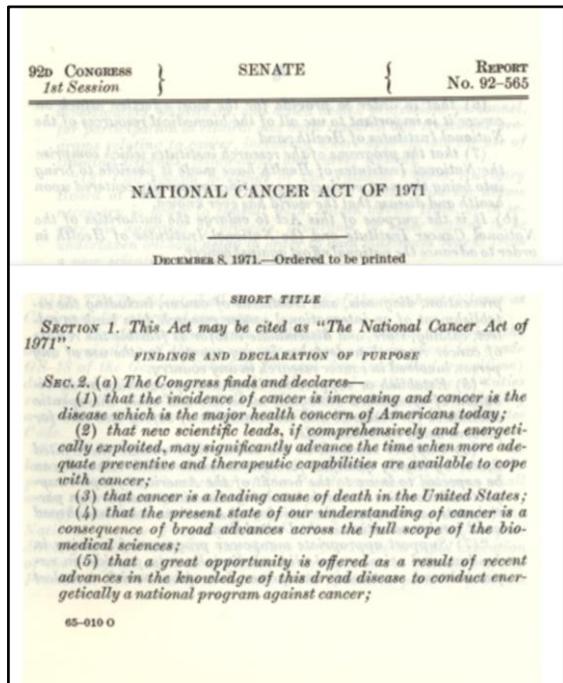


Abb. 1.1: Auszug aus dem «National Cancer Act» von 1971 (<http://www.archives.gov>).

1.1 Behandlungskonzepte in der Onkologie

Die Therapie maligner Erkrankungen bleibt auch weiterhin eine der größten medizinischen und gesellschaftlichen Herausforderungen. So weist die Krebsstatistik für Deutschland eine Zunahme an Krebsneuerkrankungen um 14 % für den Zeitraum von 2000 bis 2010 auf, wohingegen die Mortalität um 4 % abnahm (Heberger S, 2014). Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts (RKI) starben 1980 in Deutschland zwei Drittel aller Krebspatienten an ihrer Krebserkrankung, aktuell sind dies weniger als die Hälfte (www.rki.de). Der Rückgang der Mortalität ist vor allem auf Fortschritte bei der Krebstherapie zurückzuführen (Malvezzi M et al., 2012). Ein für die Krebstherapie grundlegendes Behandlungskonzept, das bereits in den 1960er Jahren entwickelt wurde, ist die Chemotherapie (Papac RJ, 2001). Mit ihr erweiterten sich die therapeutischen Möglichkeiten von Chirurgie und Strahlentherapie. Zahlreiche, auch lebensgefährliche Nebenwirkungen der

Chemotherapie stellen auch weiterhin ein hohes Risiko für den Patienten dar (www.cancer.gov).

Die Entwicklung selektiv wirkender antikanzerogener Medikamente ist ein wesentlicher Fortschritt in der Krebstherapie. Unter dem Namen «*targeted therapy*» (engl. für gezielte Therapie) werden Wirkstoffe zusammengefasst, die sich gezielt gegen Strukturen der Krebszelle richten. Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um Wirkstoffe aus der Substanzklasse der Antikörper und der »*small molecules*«¹⁾, die u.a. durch Bindung an Oberflächenstrukturen auf der Krebszelle den Zelltod auslösen, die Neovaskularisation unterbinden (Angiogenesehemmer) oder – wie z. B. die so genannten Tyrosinkinaseinhibitoren – die Signalweiterleitung in die Krebszelle verhindern (Zhukov NV und Tjulandin SA, 2008). Zahlreiche in den 1990er Jahren getestete Antikörper oder »*small molecules*«, die heute Bestandteil gängiger Therapieschemata sind, weisen beachtliche therapeutische Erfolge auf. So werden z. B. mit dem seit 2001 eingesetzten Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Gleevec) bei der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie Remissionsraten von bis zu 60 % erreicht (Kantarjian H et al., 2002).

Die vielversprechende »*targeted therapy*« setzt die Identifizierung tumorzellenspezifischer Strukturen auf der Oberfläche oder im Inneren der Krebszelle voraus und ist Gegenstand aktueller Forschung (Sievers EL und Senter PD, 2013). Ziel ist es, neue Strukturen zu identifizieren und ihre Eignung für therapeutische Ansätze zu prüfen. So wird seit einigen Jahren der Stoffwechsel von Tumoren wieder verstärkt untersucht, nachdem dieser bereits in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts im Fokus des wissenschaftlichen Interesses stand.

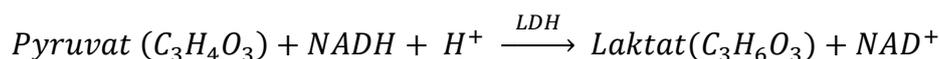
1.2 Der Stoffwechsel von Tumorzellen

Warburg und Minami berichteten im Jahr 1923 über eine starke Bildung von Milchsäure an Gewebeschnitten solider Tumoren in Gegenwart von Sauerstoff (Warburg O und Minami S, 1923). Dieses Phänomen wird als Warburg-Effekt

¹⁾ Niedermolekulare Verbindungen mit einer Molekülmasse von nicht über 800 g x mol⁻¹; sie sind teilweise in der Lage, die Zellmembran zu passieren und in der Zelle ihre Wirkung zu entfalten.

bzw. aerobe Glykolyse («*aerobic glycolysis*») bezeichnet²⁾. In normalen Körperzellen wird dagegen die Bildung von Milchsäure³⁾ durch Sauerstoff gehemmt, was als Pasteur-Effekt⁴⁾ bezeichnet wird (Pasteur L, 1861). Heute ist allgemein akzeptiert, dass Krebszellen mit Warburg-Effekt perfekt an die in soliden Tumoren vorherrschenden hypoxischen Bedingungen angepasst sind (Abb. 1.2).

Die aerobe Bildung von Milchsäure⁵⁾ in Krebszellen basiert auf der Metabolisierung von Glukose. Hierzu wird Glukose in der Glykolyse zu Pyruvat oxidiert, wobei der Großteil an Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat reduziert (hydriert) wird. Dabei werden die Reduktionsäquivalente $NADH+H^+$ zu NAD^+ oxidiert (dehydriert). Wie die Enzyme der Glykolyse befindet sich auch die LDH im Zytosol. Die Reaktion der aeroben Bildung von Milchsäure ist mit der anaeroben Milchsäuregärung identisch und lautet wie folgt:



Durch die Reduktion von Pyruvat zu Laktat verfügt die Zelle auch in Hypoxie über ausreichend regenerierte Reduktionsäquivalente, d.h. sie liegen in der oxidierten Form NAD^+ vor, um für die Glykolyse zur Verfügung zu stehen. Ohne diese Regeneration würde die Glykolyse zum Stillstand kommen bzw. es würde weniger Glukose umgesetzt werden, was das Überleben der Zelle in Hypoxie gefährden würde. Der Warburg-Effekt stellt eine Besonderheit des malignen Stoffwechsels dar (Abb. 1.2), während in Hypoxie sowohl normale als auch maligne Zellen große Mengen an Laktat bilden.

²⁾ Die Begriffe «aerobe» und «anaerobe» Glykolyse, die im englischsprachigen Raum häufig verwendet werden (*aerobic, anaerobic glycolysis*), sind problematisch, da die Glykolyse per se keinen Sauerstoff benötigt. Mit dem Begriff «*aerobic glycolysis*» werden sowohl die Zellatmung als auch der Warburg-Effekt bezeichnet und mit dem Begriff «*anaerobic glycolysis*» die Gärung bzw. Fermentation.

³⁾ Bei den in einer Zelle vorherrschenden physiologischen Bedingungen liegt Milchsäure zum größten Teil in Form seines Anions, dem Laktat vor: $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^- + \text{H}^+$.

⁴⁾ Der von Louis Pasteur 1861 bei Hefen entdeckte Effekt beschreibt den unter anaeroben Bedingungen erhöhten Umsatz von Glukose; gleichzeitig bilden die Hefen mehr Ethanol. Ein ähnlicher Effekt ist auch im Muskel unter anaeroben Bedingungen zu beobachten, wobei dieser Laktat bildet.

⁵⁾ Milchsäure entsteht ebenfalls bei der Verstoffwechslung von Glutamin («Glutaminolyse»). Die Glutaminolyse nutzt dabei Reaktionsschritte des Citratzyklus und des Malat-Aspartat-Shuttles. Die Bedeutung von Glutamin für den Tumorstoffwechsel ist nicht abschließend geklärt (s. auch Abb. 1.3).

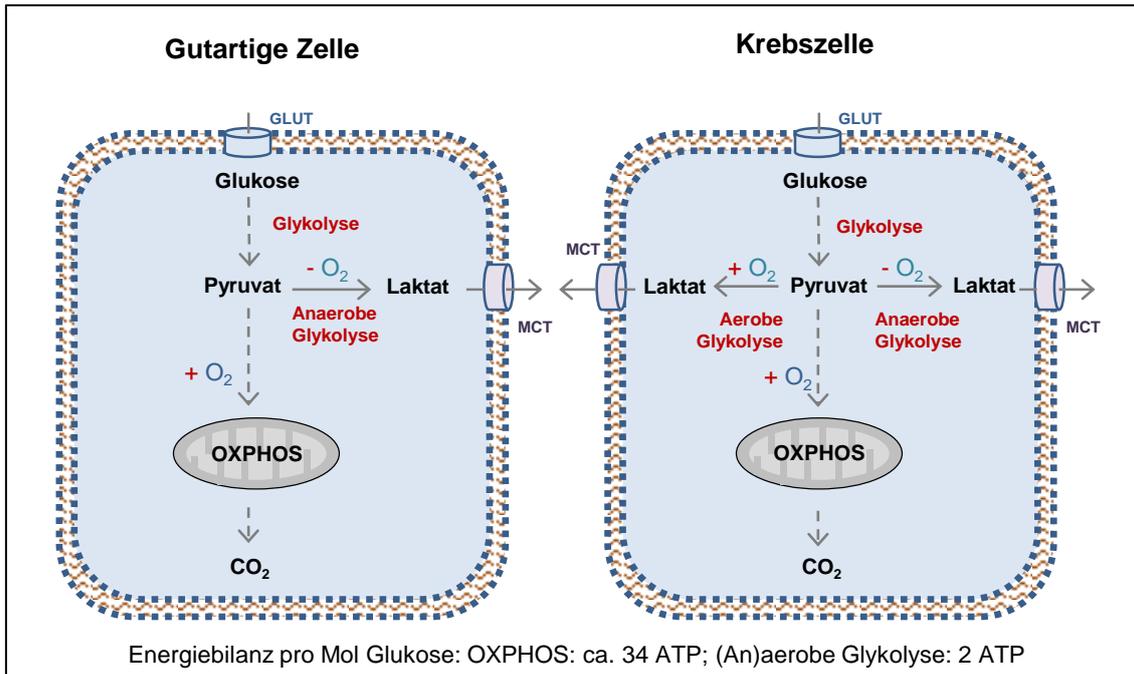


Abb. 1.2: Der Glukosestoffwechsel von normalen Körperzellen und Krebszellen in Abhängigkeit von der Versorgung mit Sauerstoff. Glukose gelangt über Glukosetransporter (GLUT) in die Zellen und wird in der Glykolyse zu Pyruvat oxidiert, dessen weitere Verstoffwechslung von der An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff (O_2) abhängt: Bei Anwesenheit von Sauerstoff wird Pyruvat in die Mitochondrien transportiert, zu Acetyl-CoA decarboxyliert und die beiden Kohlenstoffatome im Citratzyklus zu Kohlendioxid oxidiert. Der Wasserstoff wird dabei auf die Reduktionsäquivalente NAD^+ bzw. FAD übertragen (nicht dargestellt), die an der Atmungskette zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat genutzt werden (oxidative Phosphorylierung oder OXPHOS). Glykolyse, Citratzyklus und OXPHOS ermöglichen die vollständige Oxidation von Glukose zu CO_2 und H_2O bei einem maximalen Energiegewinn von ca. 34 mol ATP pro Mol Glukose. Dabei ist die Oxidation der Reduktionsäquivalente mit der Bildung von ATP über die Chemiosmose miteinander gekoppelt (Mitchell P, 1961). Bei Sauerstoffmangel verbleibt Pyruvat im Zytosol und wird dort mit Hilfe der Laktatdehydrogenase zu Laktat reduziert (anaerobe Glykolyse). Zusätzlich zur vollständigen Oxidation von Glukose in Gegenwart von Sauerstoff (OXPHOS) und zur partiellen Oxidation bei Abwesenheit von Sauerstoff (anaerobe Glykolyse) verfügen Krebszellen über die Fähigkeit, Glukose auch bei Anwesenheit von Sauerstoff nur partiell zu oxidieren und dabei Laktat zu bilden (Warburg Effekt oder aerobe Glykolyse). Laktat wird über Monocarboxylat-Transporter (MCT) aus der Zelle geschleust. Schema in Anlehnung an Marie SK und Shinjo SM, 2011 mit einem Grafikprogramm selbst erstellt.

Der Anteil des Warburg-Effekts (aerobe Glykolyse) an der Entstehung maligner Erkrankungen wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Der Warburg-Effekt wurde allenfalls als ein Nebeneffekt, nicht aber als Ursache der Krebsentstehung gesehen. Im Jahr 2000, 30 Jahre nach Warburgs Tod, vertrat der US-amerikanische Biochemiker Thompson die Meinung, dass erst durch eine Änderung des Stoffwechsels eine maligne Transformation der Zelle möglich wird (Garber K, 2004). Dennoch sind die zum Warburg-Effekt führenden Ursachen weiterhin nicht gänzlich

lich bekannt. Verglichen mit der vollständigen Oxidation von Glukose ist der Warburg-Effekt, der hauptsächlich ATP aus der Glykolyse und nur zu einem geringen Teil aus der Atmungskette gewinnt, energetisch ineffizienter (Abb. 1.2). Aktuelle Untersuchungen belegen, dass der Warburg-Effekt für die Versorgung der Tumorzelle mit ATP jedoch keinen gravierenden Nachteil darstellt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass mit der Glykolyse wesentlich schneller ATP produziert wird als mit der Atmungskette (Waddell TG et al., 1999; Pfeiffer T et al., 2001; Christofk HR et al., 2008). Dieser, auf einen gesteigerten Glukoseumsatz angepasste Zellstoffwechsel, ist Grundlage für das schnelle und invasive Wachstum von Krebszellen (Upadhyay M et al., 2013). Des Weiteren stellt die Glykolyse essentielle Zwischenprodukte zur Synthese von Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen bereit und ermöglicht somit den gesteigerten anabolen Stoffwechsel von Krebszellen (Vander Heiden MG et al., 2009; Weinberg F und Chandel NS, 2009).

Phosphorylierte Glukose (Glukose-6-Phosphat) stellt sowohl für die Glykolyse als auch für den ebenfalls im Zytosol befindlichen Pentosephosphatweg einen wichtigen Ausgangsstoff dar (Abb. 1.3). Bei der Oxidation von Glukose werden Reduktionsäquivalente in Form von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ für reduktive Biosynthesen gebildet (Abb. 1.3). Hierzu gehört die Synthese von Fettsäuren, Cholesterin, Steroidhormonen oder Nukleotiden. Ein gesteigerter anaboler Stoffwechsel ist Voraussetzung für ein erhöhtes Zellwachstum, wie es für maligne Zellen charakteristisch ist.

Die im Pentosephosphatweg gebildeten Reduktionsäquivalente werden außerdem als Cofaktoren von Enzymen wie der Glutathion-Reduktase benötigt, die zum antioxidativen Schutzsystem der Zelle gehört. Zelleigene Antioxidantien schützen vor oxidativem Stress und tragen zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase bei (Abb. 1.3).

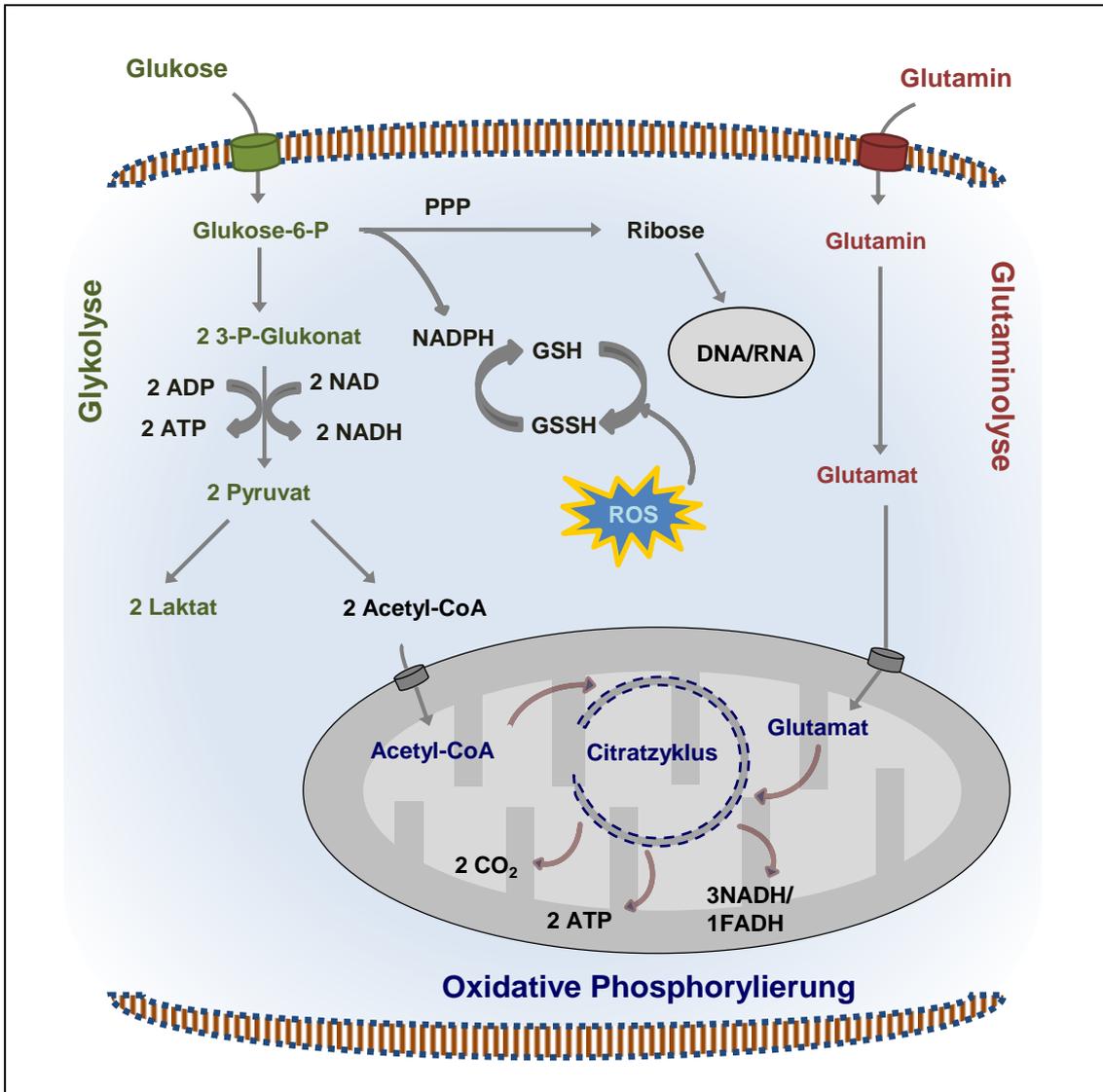


Abb. 1.3: Der Stoffwechsel der Tumorzelle: Glykolyse, oxidative Phosphorylierung, Pentosephosphatweg (PPP) und Glutaminolyse. Tumorzellen nutzen verschiedene katabole Wege, um ihren ATP-Speicher zu regenerieren. Welche Form der Energiegewinnung überwiegt, ist von der jeweiligen Tumorentität und von den äußeren Bedingungen abhängig (Zheng J, 2012). Glukose stellt das Edukt der Glykolyse (links im Bild) und des PPP dar: Nach ihrer intrazellulären Phosphorylierung wird das Zwischenprodukt Glukose-6-Phosphat entweder über die Glykolyse weiter zu Pyruvat oxidiert oder im Pentosephosphatweg zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten (NADPH) und Bausteinen (Ribose) für u.a. die Nukleinsäuresynthese genutzt. NADPH spielt u.a. bei der Regenerierung des Radikalfängers Glutathion ($\text{GS-SG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{G-SH} + \text{NADP}^+$) eine wichtige Rolle. Pyruvat wird wie in Abb. 1.2 beschrieben auch bei aeroben Bedingungen zu Laktat reduziert. Weiterhin wird Pyruvat über den Citratzyklus zu CO_2 unter Gewinnung von ATP und Reduktionsäquivalenten oxidiert (oxidative Phosphorylierung). Glutamin wird im Zuge der Glutaminolyse (rechts im Bild) intrazellulär zu Glutamat umgebaut, in den Mitochondrien in den Citratzyklus eingeschleust und zu CO_2 oxidiert. Dabei werden ATP und Reduktionsäquivalente gebildet. Die Bedeutung von Glutamin für den Stoffwechsel von Tumorzellen ist nicht abschließend geklärt (Hensley CT et al., 2013) und nicht Gegenstand dieser Arbeit. Schema in Anlehnung an Wall BA et al., 2013 mit einem Grafikprogramm selbst erstellt.

Die durch den Warburg-Effekt induzierte Bildung von Laktat führt zu einer intrazellulären Ansäuerung der Tumorzelle (»intrazelluläre Azidose«). Dies erfordert verschiedenartige Anpassungen der Tumorzelle. Hierzu gehören eine gesteigerte Resistenz gegenüber der säureinduzierten Apoptose und eine verstärkte Expression von Membrantransportproteinen zum Transport von Laktat. Laktat wird gegen den Konzentrationsgradienten nach außen transportiert, wodurch sich in der unmittelbaren Umgebung des Tumors ein azidotisches Mikromilieu ausbildet (Gatenby RA und Gillies RJ, 2004). Die verminderte Blutversorgung des Tumors, die den Abtransport von Laktat behindert, verstärkt die extrazelluläre Azidose (Kim JW et al., 2007). Es resultiert eine Laktat-induzierte Degradation der extrazellulären Matrix und der gesunden Nachbarzellen, welche die Invasivität einzelner Tumorzellen begünstigt (Gatenby RA und Gillies RJ, 2004). Zudem schützt die Azidose den Tumor vor der Zerstörung durch Immunzellen (Fischer K et al., 2007).

1.3 Hypoxie und oxidativer Stress

Als Auslöser für den in Normoxie nachweisbaren Warburg-Effekt wird im Wesentlichen die unzureichende Versorgung solider Tumoren mit Sauerstoff (Tumorhypoxie) verantwortlich gemacht. Es ist allgemein akzeptiert, dass im Gewebe Hypoxie vorherrscht, wenn die Sauerstoffkonzentration weniger als 2 % beträgt (Bertout JA et al., 2008). Die wesentliche Ursache für Tumorhypoxie ist die abnorme Vaskularisation und Perfusion von Tumoren, die zu einer verminderten Diffusion führen (Höckel M und Vaupel P, 2001; Vaupel P und Mayer A, 2007). Untersuchungen von Gatenby und Gillies haben das Ausmaß dieser Minderversorgung eindrucksvoll verdeutlicht. In einem soliden Tumor herrschen bereits hypoxische Bedingungen, wenn die Zellen mehr als 5 bis 10 Zellschichten von einem versorgenden Blutgefäß entfernt liegen (Gillies RJ und Gatenby RA, 2007). Für diese Zellen steht ausschließlich Glukose als Energieträger zur Verfügung, da nur aus Glukose ATP auch ohne Sauerstoff («anaerob») gebildet werden kann (Krebs H, 1971; Racker E, 1974).

Die Unterversorgung solider Tumoren *in vivo* mit Sauerstoff führt nicht dazu, dass sämtliche Zellen eines Tumors gleichzeitig hypoxischen Bedingungen ausgesetzt

sind. Das Nebeneinander von hypoxischen und normoxischen Arealen erlaubt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im soliden Tumor. Reaktive Sauerstoffspezies, die als Nebenprodukt z. B. an der mitochondrialen Atmungskette und durch NADPH Oxidasen entstehen (Bedard K und Krause KH, 2007), spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, bei der Regulation von Enzymaktivitäten und bei der Induktion von Apoptose (Castro L und Freeman BA, 2001; Gupte A und Mumper RJ, 2009). Übersteigt der intrazelluläre Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies das Potential der Zelle zur Detoxifikation, dann spricht man von oxidativem Stress, der zum Zelltod führen kann (Ryter SW et al., 2007; Gupte A und Mumper RJ, 2009). Um sich vor oxidativem Stress zu schützen, verfügt die Zelle über antioxidativ wirksame biologische Systeme⁶⁾, die als Radikalfänger überschüssige reaktive Sauerstoffspezies neutralisieren.

Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die metabolische Reprogrammierung der Krebszelle wurde in einer Arbeit von Finley und Coautoren untersucht (Finley LW et al., 2011). Die Autoren zeigten, dass der mitochondrialen NAD⁺-abhängigen Deacetylase SIRT3⁷⁾ eine Schlüsselfunktion bei der Ausbildung des Warburg-Effekts zukommt. SIRT3 ist an der Destabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (abgeleitet von »*hypoxic-induced factor 1*«) beteiligt, der die Expression von Genen reguliert, die für Enzyme der Glykolyse codieren (Abb. 1.4). HIF-1 besteht aus einer konstitutiv exprimierten Beta-Untereinheit (HIF-1 β) und einer Sauerstoff-abhängig regulierten Alpha-Untereinheit (HIF-1 α). Die biologische Funktion von HIF ist es, die Zelle an hypoxische Bedingungen zu adaptieren. Hierzu gehört neben der gesteigerten Expression von Enzymen der Glykolyse auch die Bildung neuer Blutgefäße (Neovaskularisierung) zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung (Bensinger SJ und Christofk HR, 2012; Semenza GL, 2012).

⁶⁾ Hierbei handelt es sich um antioxidativ wirksame Substanzen wie Glutathion, Ascorbinsäure, Ubichinol (reduzierte Form von Ubichinon, Abb. 1.7) und um Enzyme wie Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalasen (Sies H, 1994).

⁷⁾ SIRT3 gehört zur Enzymklasse der Sirtuine, abgeleitet von Gen Sir2 (»*silent mating type information regulation 2*«). Insgesamt sieben Sirtuine sind als Histon-Deacetylasen an der Regulation des humanen Zellmetabolismus beteiligt (Onyango P et al., 2002)

Die Autoren um Finley konnten zeigen, dass eine verringerte Expression von SIRT3 zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle führt. Diese stabilisieren HIF-1 α und steigern so die Expression glykolytischer Enzyme unabhängig von der Sauerstoffversorgung (Abb. 1.4). Damit verliert die Krebszelle die Fähigkeit, ihren Glukosestoffwechsel dem Sauerstoffangebot anzupassen (den so genannten Pasteur-Effekt). Umgekehrt fanden die Autoren, dass eine Überexpression von SIRT3 den Glukoseumsatz über die Glykolyse verringert und die Zellproliferation abnimmt. Dagegen wurde die zelluläre Atmung verstärkt (Finley LW et al., 2011).

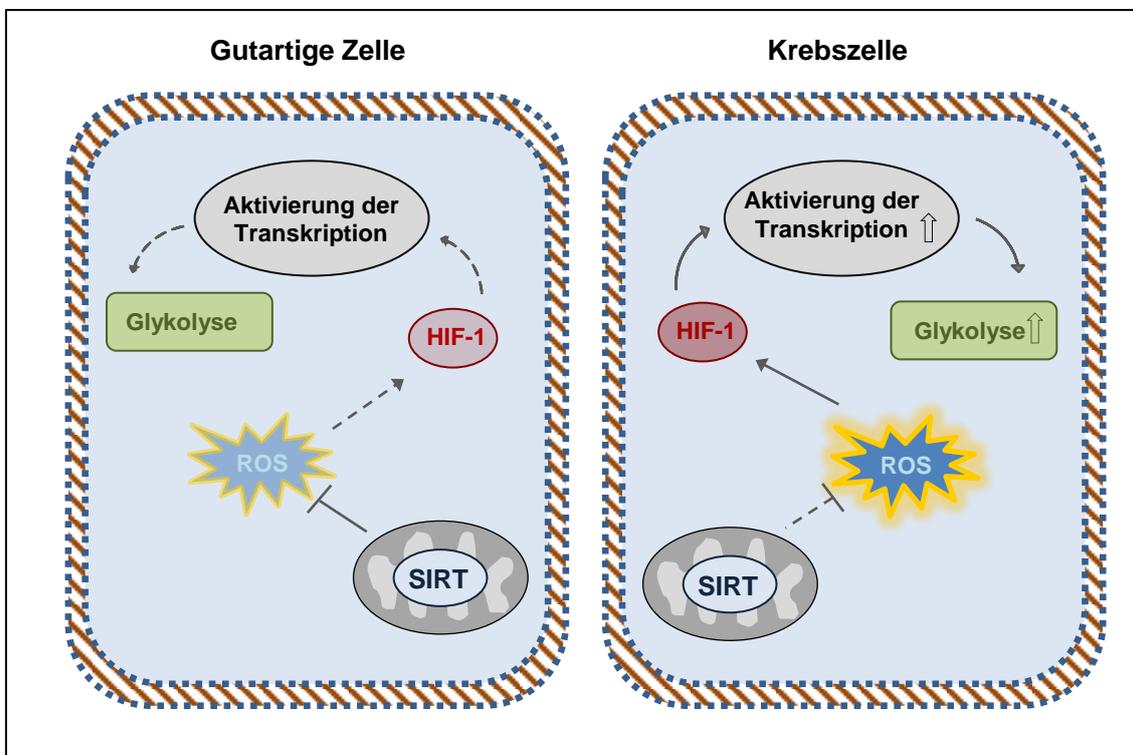


Abb. 1.4: Beispiel der metabolischen Reprogrammierung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Mitochondriale Sirtuine (SIRT) verfügen über zelluläre Regulationsfunktionen und unterdrücken die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. In Krebszellen kann die Expression der Sirtuine verringert sein, weshalb der Anteil reaktiver Sauerstoffspezies ansteigt. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 wird stabilisiert und erhöht die Expression von Enzymen der Glykolyse (Finley LW et al., 2011). Schema in Anlehnung an Chiarugi A et al., 2012 mit einem Grafikprogramm selbst erstellt.

1.4 Mechanismen des Zelltods

Mit dem Begriff Apoptose wird der »programmierte Zelltod« bezeichnet (Kroemer G et al., 2009), der über einen extrinsischen oder intrinsischen Signalweg initiiert

wird (Abb. 1.5). Botenstoffe (Zytokine), die unter anderem von zytotoxischen T-Lymphozyten freigesetzt werden, aktivieren den extrinsischen Signalweg. Hierzu binden die Zytokine an einen membranständigen »*First Apoptosis Signal*« (FAS)-Rezeptor, der über seine zytoplasmatische Domäne (»*death-receptor*«) letztlich zur Aktivierung von Effektor-Caspasen (v.a. Caspase 3, 7, 9) und damit zum Zelltod führt. Die Zelle wird dabei proteolytisch verdaut und die auf Vesikel verteilten Abbauprodukte von Phagozyten aufgenommen (Degterev A und Yuan J, 2008; Ouyang L et al., 2012). Der intrinsische oder auch mitochondriale Weg wird unter anderem durch oxidativen Stress und DNA-Schäden initiiert. Die gestörte Zellhomöostase führt über verschiedene Signalmoleküle zur Aktivierung von Caspasen und damit zur Einleitung von Apoptose (Degterev A und Yuan J, 2008). Während die Zelle das apoptotische Programm durchläuft, sind typische morphologische Veränderungen wie Kernfragmentierung und Ausbildung von Membranbläschen zu erkennen (Degterev A und Yuan J, 2008).

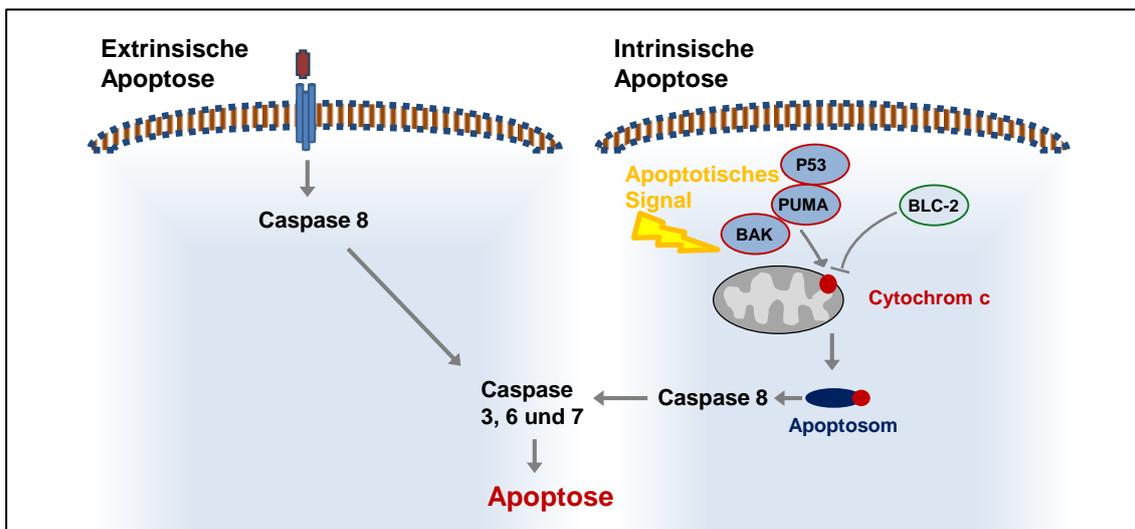


Abb. 1.5: Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose. Der extrinsische Weg wird durch Bindung eines proapoptotischen Liganden an seinen membranständigen Rezeptor initiiert und führt über eine zytoplasmatische Todesdomäne und Caspase 8 zur Aktivierung der Effektor-Caspasen 3,6,7 und damit zum Zelltod. Der intrinsische Weg wird durch intrazelluläre Botenstoffe reguliert. Bei gestörter Zellhomöostase überwiegen proapoptotische Moleküle (u.a. P-53, PUMA, BAK) im Vergleich zu antiapoptotischen Molekülen (BCL-2). Aus der inneren Mitochondrienmembran freigesetztes Cytochrom c führt zur Bildung des Apoptosoms mit Aktivierung der Caspasenkaskade. Schema in Anlehnung an Ashkenazi A., 2008 mit einem Grafikprogramm selbst erstellt.

Eine Besonderheit der Apoptose stellt die Autophagie dar. Hierbei handelt es sich um den zelleigenen Verdau nicht funktionsfähiger Organellen (Maiuri MC et al.,

2007). Mit Autophagie sichert die Zelle bei Nährstoffmangel ihr Überleben durch endogene Versorgung mit Energieträgern, wofür auch funktionsfähige Strukturen abgebaut werden können (Degterev A und Yuan J, 2008). Reichen die zelleigenen Reserven nicht aus, führt der exzessive Selbstverdau zum Zellkollaps.

Ein weiteres, zum Zelltod führendes Phänomen, stellt die Nekrose dar, deren Hauptmerkmal ein Anschwellen der Zelle ist. Diesem liegt eine gestörte Barrierefunktion der Plasmamembran zugrunde, wodurch es zu einem unkontrollierten Einstrom von Flüssigkeit kommt und die Zelle schließlich zum Platzen bringt. Freigesetzte lytische Enzyme lösen eine lokale Entzündung aus (Edinger AL und Thompson CB, 2004).

1.5 Das onkologische Supportivprodukt Avemar

Seit 2002 ist das wasserlösliche Pulver aus fermentierten Weizenkeimlingen unter dem Namen Avemar als Nahrungsergänzungsmittel zugelassen und wird in 17 Ländern vertrieben (Heimbach JT et al., 2007). Dem Produkt werden nicht nur positive Effekte bei der Behandlung von Tumorerkrankungen, sondern auch bei der Behandlung von Autoimmun-



Abb. 1.6: Das Nahrungsergänzungsmittel Avemar (www.avemar.com).

und Herzerkrankungen zugesprochen (Boros LG et al., 2005). Für Avemar sind kaum Nebenwirkungen aus klinischen Studien bekannt (Jakab F et al., 2003; Demidov LV et al., 2008). Auch mutagene oder gentoxische Eigenschaften von Avemar wurden ausgeschlossen (Boros LG et al., 2005; Heimbach JT et al., 2007).

Die Herstellung von Avemar basiert auf einem patentierten Herstellungsverfahren, bei dem die zu 0,04 % in Weizenkeimlingen enthaltenen 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone (DMBQ) durch Fermentation mit *Saccharomyces cerevisiae* aus ihren glykosidischen Bindungen gelöst werden (Hidvegi M et al., 1999). Chinone stellen ubiquitär in der Natur vorkommende reaktive Verbindungen dar, die zwei

Carbonlygruppen in ortho- oder para-Stellung sowie zwei Kohlenstoffdoppelbindungen aufweisen. Bekannte Chinone sind das in der Atmungskette am Elektronentransport beteiligte Ubichinon sowie eine Reihe von Farbstoffen (Abb. 1.7).

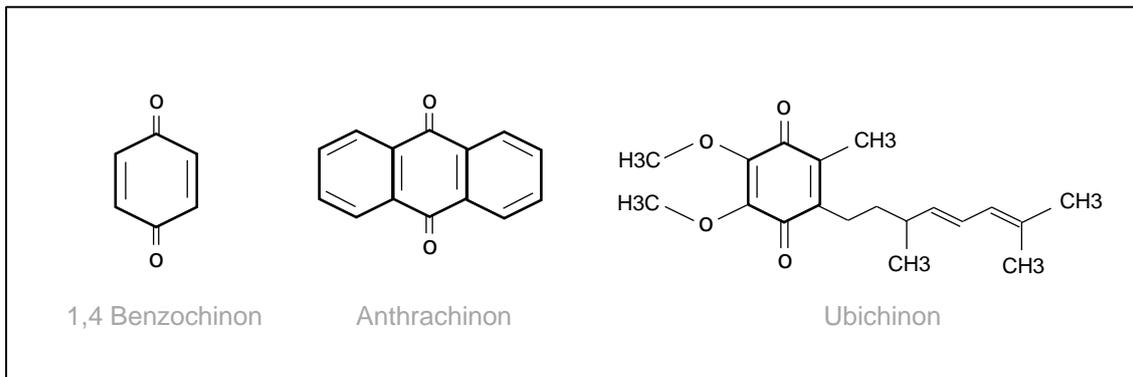


Abb. 1.7: Moleküle mit chinoider Struktur. 1,4 Benzochinon (als 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone oder DMBQ in Weizenkeimlingen enthalten), Anthrachinon (Grundstoff von Farbstoffen) und Ubichinon (Bestandteil der Atmungskette in Mitochondrien).

Die antitumorale Wirkung von DMBQ wurde bereits in den frühen 1980er Jahren bestätigt (Pethig R et al., 1983). Dabei wurden DMBQ mit einem geeigneten Reduktionsmittel wie der Ascorbinsäure zu langlebigen Semichinonradikalen reduziert, die entweder selbst oder durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zytotoxisch wirken (Abb. 1.8). Auch intrazelluläre Enzyme wie NADPH-abhängige Flavoenzyme können Elektronen auf DMBQ übertragen und damit Semichinonradikale bilden (Bachur NR et al., 1978). Einen Schutz vor Semichinonradikalen bietet die DT-Diaphorase, ein Enzym, das eine Zwei-Elektronen-Reaktion zur Bildung von unschädlichem Hydrochinon katalysiert (Lind C et al., 1982) (Abb. 1.8).

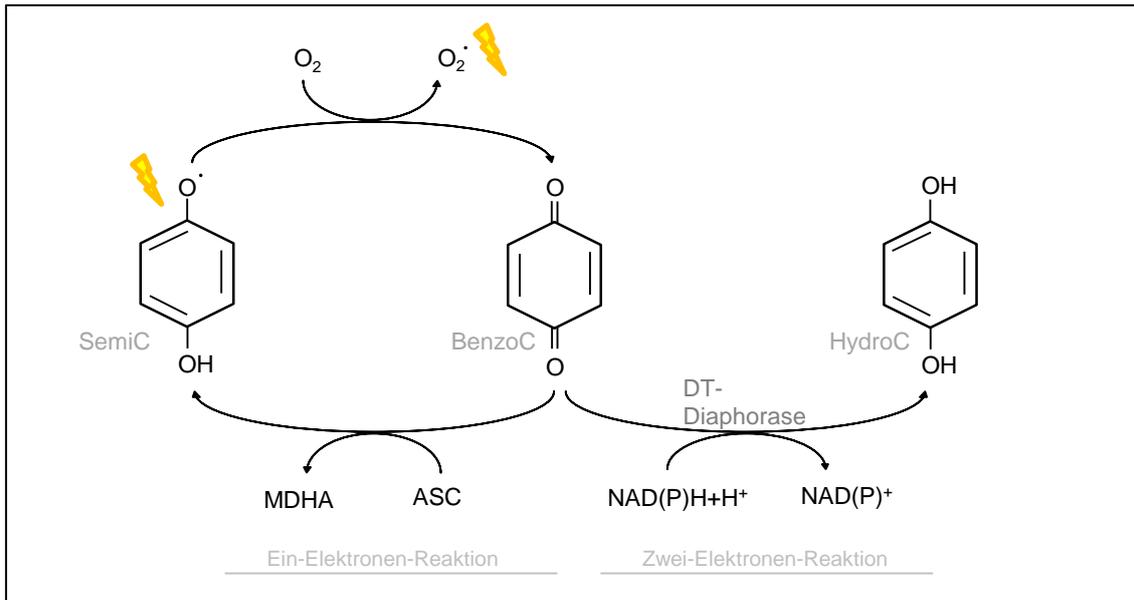


Abb. 1.8: Ein- und Zwei-Elektronen-Reaktionen am Beispiel des 1,4 Benzochinons. Benzochinon (BenzoC) wird je nach Reaktionspartner entweder durch eine Ein-Elektronen-Reaktion zum Semichinonradikal (SemiC) oder durch eine Zwei-Elektronen-Reaktion zum Hydrochinon (HydroC) reduziert. Ascorbinsäure (ASC) als Reduktionsmittel löst eine Ein-Elektronen-Reaktion aus, wobei Ascorbinsäure zum Monodehydroascorbat (MDHA) oxidiert wird. Zelleigene NADPH-abhängige Flavoenzyme katalysieren ebenfalls die Ein-Elektronen-Reduktion. Hierbei entstehen langlebige Semichinonradikale, die entweder selbst die DNA und damit die Zelle schädigen oder durch Reaktion mit Sauerstoff (O₂) reaktive Sauerstoffspezies bilden. Diese führen in der Zelle zu oxidativem Stress (Kapitel 1.2). Die Zwei-Elektronen-Reaktion wird durch die intrazelluläre DT-Diaphorase unter Oxidation von NAD(P)H katalysiert.

In den vergangenen 15 Jahren wurde das antikanzerogene Potential von Avemar *in vitro* und *in vivo* an unterschiedlichen Tumorzelllinien bzw. Tumorentitäten untersucht. Synergistische Effekte von Avemar in Kombination mit Standardchemotherapeutika wurden nachgewiesen (Jakab F et al., 1999; Jakab F et al., 2003; Demidov LV et al., 2008). Ein positiver Einfluss von Avemar auf verschiedene tumorassoziierte Faktoren wie Kachexie, Metastasierung oder progressionsfreies Überleben wurde ebenfalls gezeigt (Jakab F et al., 1999; Jakab F et al., 2003). Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, die nach der Operation zusätzlich zur Standardtherapie täglich noch Avemar einnahmen, zeigten sich signifikant weniger Lokalrezidive und Metastasen als bei Patienten der Vergleichsgruppe (Jakab F et al., 2003). Bei Melanom-Patienten war eine adjuvante Chemotherapie in Kombination mit Avemar der alleinigen Chemotherapie hinsichtlich dem progressionsfreien Intervall überlegen (Demidov LV et al., 2008).

Die antikanzerogene Wirkung von Avemar wurde von der Gruppe um Comin-Anduix und Saiko auf Stoffwechselebene untersucht. Erstere berichtete über eine Herunterregulation wichtiger Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs durch Avemar (Comin-Anduix B et al., 2002). Damit fehlen der Zelle die für eine Zellteilung wichtigen Reduktionsäquivalente und Ribonukleotide. Zudem hemmt Avemar die Aktivität der Ribonukleotidreduktase, ein Schlüsselenzym der DNA-Synthese (Saiko P et al., 2007).

1.6 Ziele

In der vorliegenden Arbeit wurde der antiproliferative und antimetabolische Effekt von Avemar an humanen gastrointestinalen Karzinomzellen *in vitro* untersucht. Das antikanzerogene Potential von Avemar wird auf die zytotoxische Wirkung von DMBQ zurückgeführt (Hidvegi M et al., 1998). Ein Ziel der Arbeit war somit, durch den Vergleich von Avemar und einer äquimolaren Konzentration an chemisch reinem DMBQ die Bedeutung der Benzochinone für das antikanzerogene Potential von Avemar zu klären. Dazu gehörte, die durch DMBQ und Avemar induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu bestimmen.

Um den Einfluss von Benzochinon-Radikalen und/oder reaktiven Sauerstoffspezies auf den Stoffwechsel von Tumorzellen zu untersuchen, wurden zusätzlich Messungen zum Zellzyklus, zum Glukoseverbrauch, zur Laktatbildung, zum zellulären ATP-Gehalt und zum NADH/NAD⁺ Verhältnis durchgeführt.

Weiterhin wurde die Selektivität der Avemar-vermittelten Zytotoxizität gegenüber malignen und nicht-malignen Zellen untersucht. Hierzu wurden bisher nur wenige Arbeiten publiziert (Comin-Anduix B et al., 2002; Fajka-Boja R et al., 2002). Zudem wurde die zytotoxische Wirkung von Avemar an humanen Fibroblasten untersucht, die für solche Untersuchungen häufig eingesetzt werden (Issaeva N et al., 2004).

2 Fragen

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum antiproliferativen und antimetabolischen Effekt von Avemar an drei humanen gastrointestinalen Tumorzelllinien durchgeführt. Hierzu wurden folgende Fragen gestellt:

- 1) Welche antiproliferativen Effekte weist Avemar an den drei humanen gastrointestinalen Tumorzelllinien und an humanen Fibroblasten auf?
- 2) Wird das antikanzerogene Potential von Avemar durch DMBQ-induzierten oxidativen Stress ausgelöst?
- 3) Welche zellspezifischen Eigenschaften begünstigen den antiproliferativen Effekt von Avemar?

3 Material und Methoden

3.1 Kulturmedien und Pufferlösung

Medium für Tumorzellen

Kulturmedium RPMI 1640 in »Dutch Modification« (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit folgenden Zusätzen (Endkonzentration jeweils in Klammern): Penicillin G (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/L), Natriumpyruvat (1 mmol/L), Glukose (11 mmol/L), Glutamin (2 mmol/L), 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (alle Zusätze von Invitrogen GmbH, Karlsruhe) sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Cell Concepts GmbH, Umkirch).

Medium für Fibroblasten (»Fibroblast Growth Medium 2«, FGM2)

FGM2 Medium (PromoCell, Heidelberg) mit folgenden Zusätzen (Endkonzentration jeweils in Klammern): Insulin (5 µg/mL), bFGF (1 ng/mL), Glukose (8 mmol/L) und 2 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum.

PBS (»Phosphate buffered saline«)

Phosphatgepufferte Salzlösung (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) bestehend aus Natriumchlorid (140 mmol/L), Kaliumchlorid (2,7 mmol/L), Natriumdihydrogenphosphat (7,2 mmol/L) sowie Kaliumhydrogenphosphat (1,47 mmol/L).

3.2 Zelllinien, Zellkultur und Zellernte

Zelllinien sowie deren Bezugsquelle sind in Tabelle 3.1 angegeben.

Tabelle 3.1: Die in der Arbeit untersuchten humanen Tumorzelllinien und Fibroblasten.

Zelllinie	Gewebe / Zelltyp	Bezugsquelle
23132/87	Magen	DSMZ ^{*)} , Kat.-Nr.: ACC 201
BxPc-3	Pankreas	ATCC ^{**)} , Kat.-Nr.: CRL-1687
HRT-18	Rektum	ATCC ^{**)} , Kat.-Nr.: CCL-244
NHDF-p	Dermale Fibroblasten	PromoCell, Kat.-Nr.: C-12350

^{*)} Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

^{**)} American Type Culture Collection (www.atcc.org)

Die Zellen wurden nach ihrer Aussaat mit RPMI 1640 Medium in 25 cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) bei Standardbedingungen von 37°C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator (NU-5500, NuAire Inc., Plymouth, USA) kultiviert. Zweimal pro Woche wurde das Kulturmedium gewechselt und einmal pro Woche die Zellen passagiert. Hierzu wurden nach Absaugen des Mediums die Zellen mit 5 mL einer 0,05 % Trypsin /0,22 % EDTA-Lösung (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) für 3 bis 5 Minuten inkubiert. Die vom Boden der Kulturflasche abgelösten Zellen wurden in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-one, Frickenhausen) überführt, die Zellsuspension für 6 Minuten bei 396 xg zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet mit PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mit Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) angefärbt und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) bestimmt.

3.3 Reagenzien

3.3.1 Avemar

Das Weizenkeimextrakt Avemar (Biropharma, Budapest, Ungarn) wurde in der Ausgangskonzentration von 100 mg/mL in Kulturmedium mit 10 % FCS gelöst und anschließend für 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die Lösung wurde steril filtriert (0,2 µm-Filter) und auf eine Endkonzentration von 10 mg/mL eingestellt.

3.3.2 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone (DMBQ)

2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden zu 0,1 mg/mL (Molekulargewicht: 168,15 g/mol) in Kulturmedium gelöst und für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die klare Lösung wurde steril filtriert und auf eine in Avemar (10 mg/mL) zu 0,04 % Benzochinone (Hidvegi M et al., 1999) äquimolare Konzentration von 0,004 mg/mL bzw. 24 µmol/L Benzochinone eingestellt: $10 \text{ g/L} \times 0,0004 / 168,15 \text{ g/mol} = 2,38 \times 10^{-5} \text{ mol/L} = 24 \text{ µmol/L}$.

3.3.3 Ascorbinsäure

Basierend auf Vorversuchen der Arbeitsgruppe wurde das Reduktionsmittel Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) im Verhältnis von 1:100 (DMBQ zu Ascorbinsäure) eingesetzt (Endkonzentration: 2,4 mmol/L). Dazu wurde eine Stammlösung von 568 mmol/L (100 g/L) Ascorbinsäure (176,12 g/mol) angesetzt, für 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend steril filtriert.

3.4 Kristallviolett-Assay

Die Anzahl vitaler Zellen als Maß der Zellvitalität wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Der Farbstoff Kristallviolett bindet an das Phosphatrückgrat der DNA vitaler Zellen. Dabei besteht eine direkte Proportionalität zwischen der Anzahl an Kristallviolett-molekülen und der Zellzahl. Für die photometrische Messung wird das gebundene Kristallviolett in Lösung gebracht und die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt (Gillies RJ et al., 1986).

In Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen (96 Well-Platten) wurden pro Vertiefung $1,5 \times 10^4$ Zellen in jeweils 200 μ L Medium ausgesät. Versuch und Kontrollen wurden in jeweils 6 Vertiefungen (technische Replikate) angesetzt. Mediumreplikate ohne Zellen bzw. Replikate der Testsubstanz in Medium (ohne Zellen) wurden zur Bestimmung der Blindwerte (*»blank values«*), und damit zur Korrektur der Messwerte angesetzt. Die ausgesäten Zellen wurden für 16 Stunden inkubiert. Nach Adhärenz der Zellen wurde die optische Dichte der Ausgangszellzahl bestimmt und sämtliche Messwerte hierauf normiert. Der Versuchsansatz begann mit dem Wechsel des Kulturmediums mit dem auch Avemar oder DMBQ zugegeben wurden. Anschließend wurden die Zellen für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert (Abb. 3.1). Für einige Versuche wurde die Inkubationszeit auf 96 bzw. 120 Stunden verlängert.

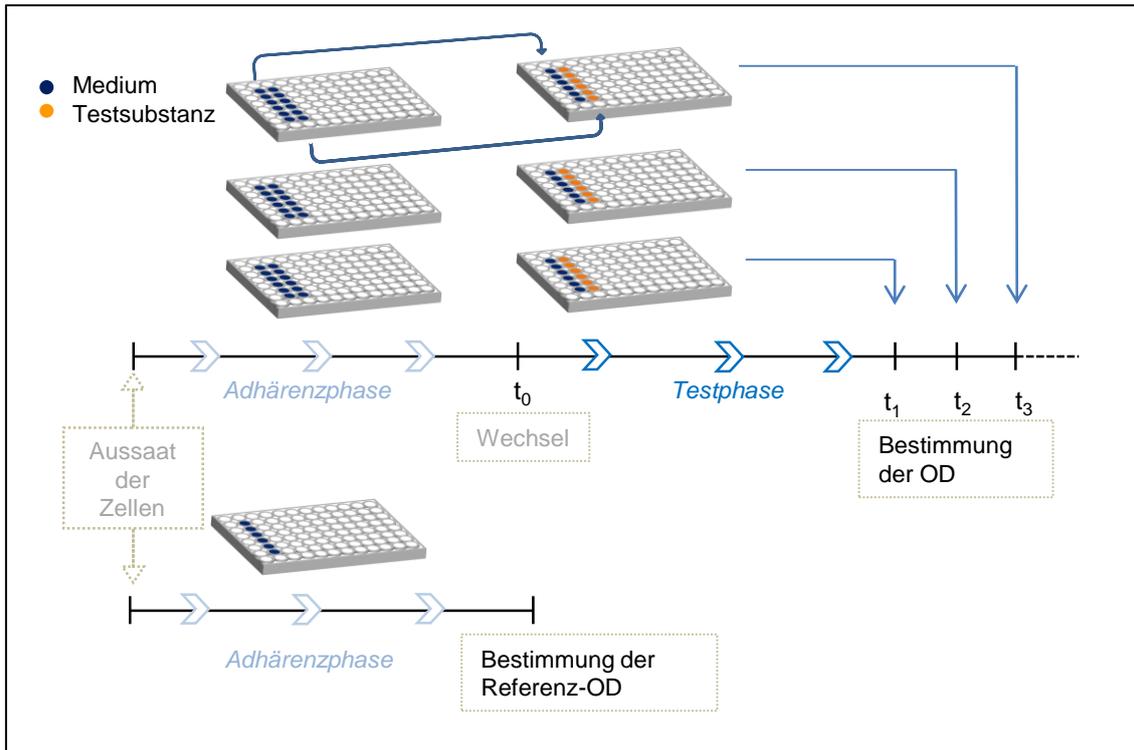


Abb. 3.1: Versuchsaufbau zur Untersuchung Avemar- und DMBQ-vermittelter antiproliferativer Effekte mit dem Kristallviolett-Assay. In Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen (96 Well-Platten) wurden jeweils $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung ausgesät. Im Anschluss an eine 16-stündige Inkubation zur Adhärenz der Zellen wurde die optische Dichte (OD) der Ausgangszellzahl bestimmt (Referenz-OD) und sämtliche Messwerte einer Messreihe hierauf normiert. Im Anschluss an die Adhärenzphase (t_0) wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit frischem Medium bzw. mit Medium plus Avemar oder DMBQ für einen Zeitraum von weiteren 24 bis 120 Stunden inkubiert (Testphase).

Zum Versuchsende wurde der Überstand aus den Vertiefungen der 96 Well-Platten abgesaugt, die Zellen mit 100 μ L Methanol pro Vertiefung fixiert und – nach Entfernen des Methanols – mit 100 μ L Kristallviolett-Lösung (0,5 g Kristallviolett gelöst in 25 mL Methanol und 75 mL PBS) für 10 Minuten gefärbt. Überschüssiges Kristallviolett wurde durch viermalige Zugabe von Aqua dest. mit anschließendem Absaugen aus den Vertiefungen entfernt und die Zellkulturschalen für 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurde der Farbstoff durch Zugabe von jeweils 200 μ L 10 %iger Essigsäure wieder in Lösung gebracht. Hierzu wurden die Zellkulturschalen für 30 Minuten auf einem Schüttler (max. 200 rpm) gestellt und anschließend mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm ausgemessen. Um die Eignung des Kristallviolett-Assays zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen zu überprüfen, wurde für jede der

drei humanen Karzinomzelllinien HRT-18, 23132/87 und BxPc-3 eine Verdünnungsreihe mit 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 und 8×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 96 Well-Platte erstellt und die Zellen für 2 Stunden inkubiert. Sie wurden mit Kristallviolett gefärbt und die optische Dichte bestimmt (Abb. 3.2). Mit Hilfe der Standardkurven wurde der Anteil an ATP und reaktiven Sauerstoffspezies auf die Zellzahl berechnet (Kapitel 3.5 und 3.6).

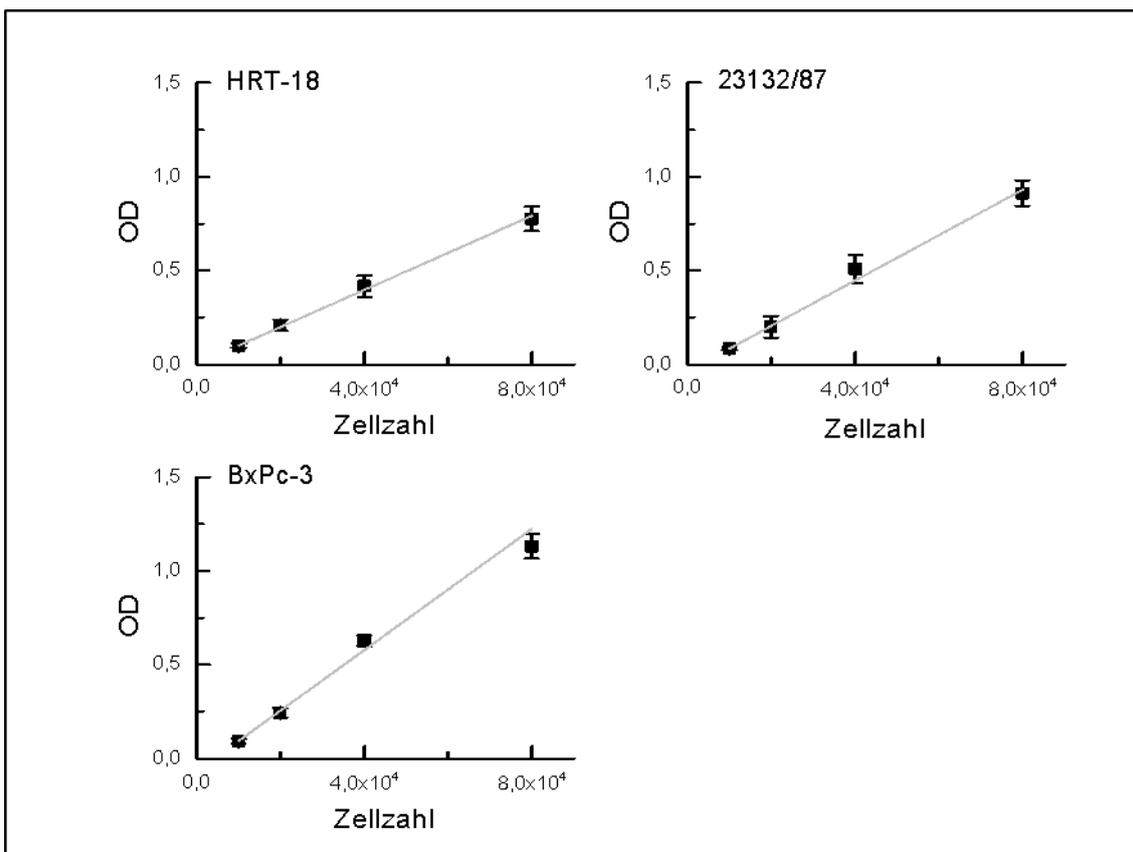


Abb. 3.2: Der Kristallviolett-Assay zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen. Für jede Zelllinie (HRT-18, 23132/87, BxPc-3) wurden 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 und 8×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 96 Well-Platte ausgesät und die optische Dichte bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert von 4-6 Messwerten \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) angegeben.

Die Verdopplungs- bzw. Generationszeiten (g) wurden auf Basis der mit dem Kristallviolett-Assay ermittelten Werte nach folgender Formel berechnet:

$$g = \log 2 \times \Delta t / \log N - \log N_0$$

Δt Kulturdauer in Stunden; N_0 Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt Null; N Anzahl der Zellen zum Ablesezeitpunkt.

3.5 ATP-Assay

Der zelluläre Gehalt an dem wichtigen Energieträger ATP gibt Aufschluss über die Energieversorgung und damit über die Vitalität der Zelle. Der ATP-Gehalt wurde mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay von Promega (Madison, USA) bestimmt. Hierbei katalysiert das Enzym Luciferase die Oxidation von Luciferin unter Abstrahlung von Lumineszenzlicht. Bei dieser ATP-verbrauchenden Reaktion ist der ATP-Verbrauch proportional zur Ausbeute an Lumineszenzlicht.

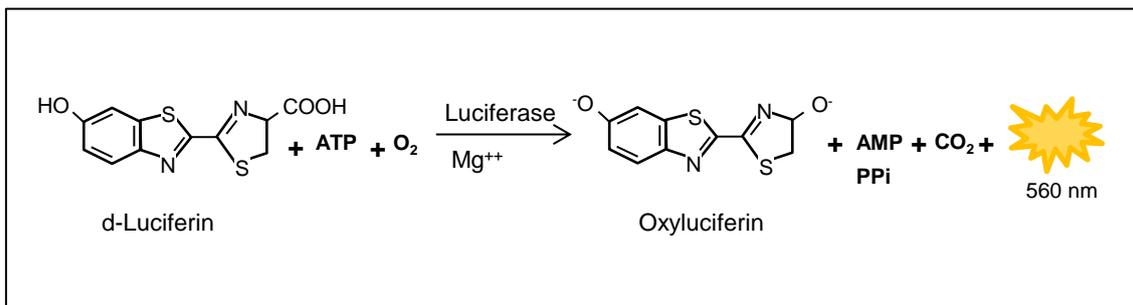


Abb. 3.3: Die Lumineszenz-basierte Quantifizierung von ATP. Das Enzym Luciferase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin. Dadurch kommt es zur Emission von Licht, das proportional zum ATP-Gehalt der Zelle ist. Die Stärke der Lichtemission wird mit einem Luminometer detektiert (<http://www.promega.com>).

Jeweils $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung einer weißen 96 Well-Platte wurden für 24 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit jeweils 100 μ L Zelllyse-Puffer pro Vertiefung lysiert. Nach 10 Minuten wurden 50 μ L ATP-Reaktionslösung zugegeben, für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend die Lumineszenz bestimmt. Aus einer frisch angesetzten Stammlösung von 100 mmol/L ATP (Sigma Aldrich) wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt: 10 μ mol/L, 1 μ mol/L, 100 nmol/L, 10 nmol/L. Von jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 100 μ L auf eine weiße 96 Well-Platte überführt und nach Zugabe von Zelllysepuffer und ATP-Reaktionslösung die Lumineszenz bestimmt. Parallel dazu wurde der Anteil vitaler Zellen mit dem KV-Assay bestimmt (Kapitel 3.4) und der Gehalt an ATP in $\text{pg}/10^6$ Zellen berechnet.

3.6 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Messung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde mit dem OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit von Cellbiolabs (San Diego, USA) für eine Inkubationsdauer von 24 Stunden durchgeführt. Reaktive Sauerstoffspezies oxidieren in der Zelle den Farbstoff DCFH zu fluoreszierendem 2', 7'- Dichlorofluorescein (DCF). Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zum intrazellulären Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (Abb. 3.4).

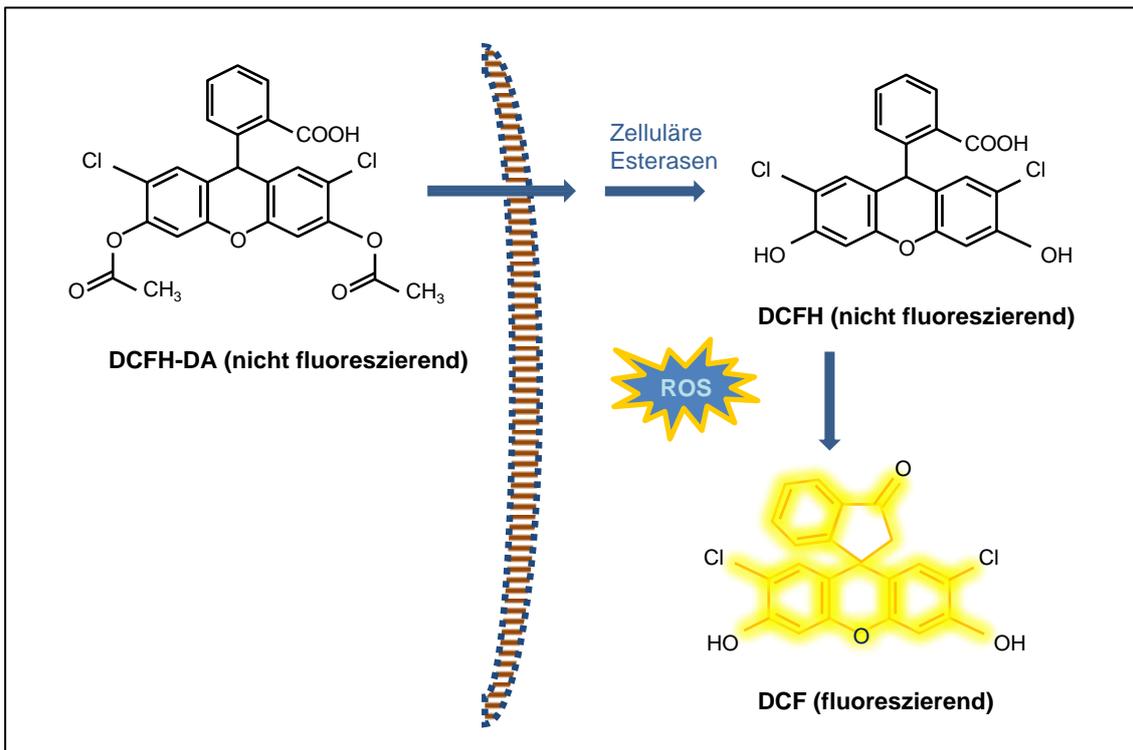


Abb. 3.4: Die Messung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies mit dem fluoreszierenden Farbstoff DCF. Der Farbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFH-DA) wird durch intrazelluläre Esterasen zu 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) umgewandelt. Dieses wiederum wird durch intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zum fluoreszierenden 2', 7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert (<http://www.cellbiolabs.com>).

1,5 x 10⁴ Zellen pro Vertiefung wurden in transparente 96 Well-Platten ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen wurde der Überstand abgesaugt und die Vertiefungen mit PBS gewaschen (mehrmaliges Zugeben und Absaugen von PBS). Nach Zugabe von DCFH-DA (gelöst in Methanol und in Medium auf die Endkonzentration von 100 µmol/L verdünnt) wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Das Medium mit DCFH-DA wurde entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 200 µL Medium (Kontrolle) bzw. Medium plus Testsubstanz für 24 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde am nächsten Tag entfernt, die Vertiefungen mit PBS gewaschen und die Zellen mit 100 µL Zellysepuffer (plus 100 µL PBS) lysiert. Nach 5 Minuten Inkubation wurden aus jeder Vertiefung 150 µL auf eine schwarze 96 Well-Platte überführt und mit einem TECAN-Fluorometer (Anregung 485 nm, Emission 530 nm) gemessen. Der Anteil an reaktiven Sauerstoffspezies wurde in relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben und auf 10⁴ Zellen normalisiert. Hierzu wurde der Anteil vitaler Zellen mit dem KV-Assay bestimmt (Kapitel 3.4). Mögliche, die Zellvitalität beeinflussende Effekte von DCFH-DA wurden im Vorfeld ausgeschlossen (nicht gezeigt).

3.7 Zellzyklus-Analyse mit Durchflusszytometrie (FACS)

Zur durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus wird der DNA-Anteil der Zellpopulation mit dem fluoreszierenden Farbstoff Propidiumjodid bestimmt (Abb. 3.5). Der DNA-Gehalt der Zellen ist abhängig von der jeweiligen Zellzyklusphase (Krishan A, 1975). In der Interphase findet die Zellreplikation statt. Diese gliedert sich in die präsynthetische G1 (Gap1)-Phase mit einfachem Chromosomensatz, die DNA-Verdopplungsphase oder S (Synthese)-Phase und die postsynthetische G2 (Gap2)-Phase mit doppeltem Chromosomensatz. Ein Teil der Zellen geht von der G1-Phase in ein Ruhestadium, die G0 (Gap0)-Phase über. Im Anschluss an die Interphase folgt die Mitose/M-Phase mit doppeltem Chromosomensatz, in der es zur Zellteilung kommt.

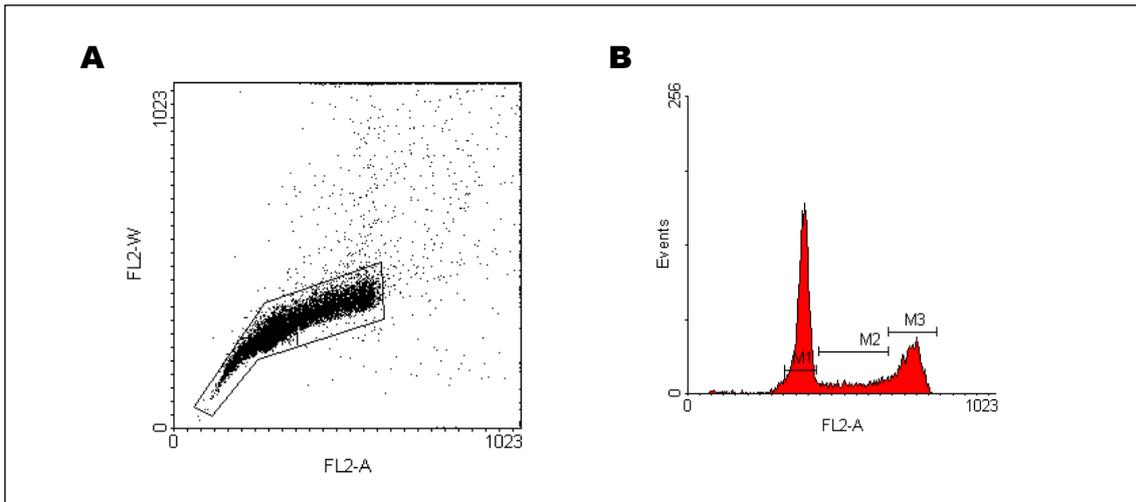


Abb. 3.5: Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse. (A) Zur Bestimmung der Zellzyklusphasen werden die zu untersuchenden Zellen in einem FL2-A/FL2W-Plot unter Ausschluss von Dubletten markiert. (B) Histogrammdarstellung der in Teilabbildung A ausgewählten Zellpopulation. Die Subpopulationen sind mit M1, M2, M3 markiert, um die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen zu berechnen. Dabei entspricht der Bereich M1 der Zellpopulation in der G0/G1-Phase (einfacher DNA-Gehalt), M2 der Zellpopulation in der S-Phase (DNA-Replikation), M3 der Zellpopulation in der G2/M-Phase (doppelter DNA-Gehalt). Darstellung der Auswertung mit dem Programm WinMDI Version 2.9 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

Um den Einfluss von Avemar auf die Zellteilung zu untersuchen, wurden die in 75 cm² Kulturflaschen kultivierten Zellen mit Avemar (10 mg/mL) für 24 Stunden inkubiert. Jeweils 1 x 10⁶ Zellen wurden in 70 % Ethanol (-20°C) bei -4°C fixiert und für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 6 Minuten bei 397 xg zentrifugiert, mit PBS resuspendiert und mit RNase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in einer Endkonzentration von 50 µg/mL für 30 Minuten bei 37°C im Dunklen inkubiert. Nach Zugabe von Propidiumjodid (Sigma-Aldrich, Stammlösung: 1 mg/mL, Endkonzentration: 50 µg/mL) wurden die Zellen im Durchflusszytometer (FACScan™, Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Als Endpunkt jeder Messung wurden 10.000 Ereignisse mit dem Programm BD CellQuest™ Pro (Version 5.1.1) gespeichert.

3.8 Caspase 3/7 Aktivitätsassay

Die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 als Markerenzyme zur Induktion von Apoptose wurde mit dem Caspase-Glo® 3/7 Assay von Promega (Madison, USA) bestimmt. Der Test basiert auf einer Luciferase katalysierten Reaktion, bei der es zur Emission von Licht kommt. Das Lumineszenzsignal ist proportional zur Caspase-Aktivität in den untersuchten Zellen (Abb. 3.6).

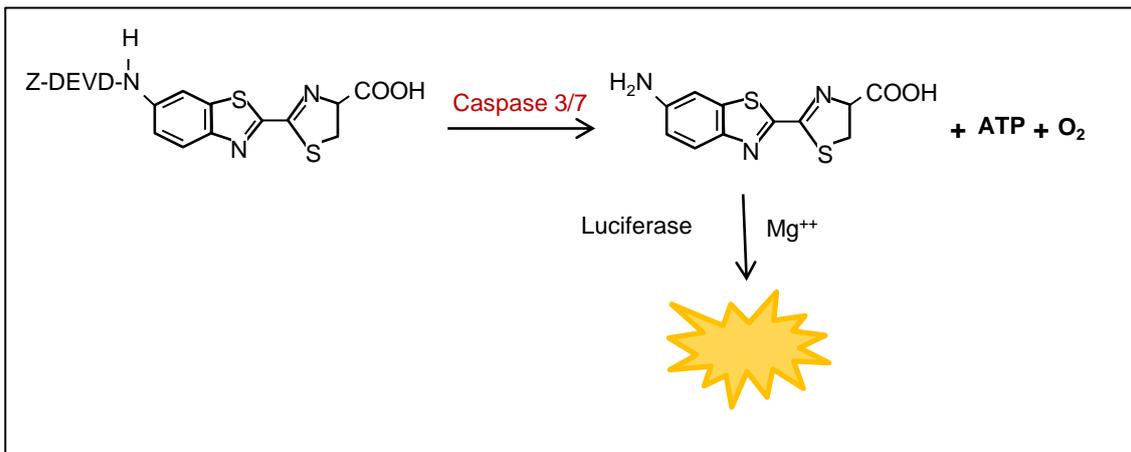


Abb. 3.6: Der Nachweis aktivierter Caspase 3/7. Aktive Caspase 3/7 katalysiert die Abspaltung des Tetrapeptids DEVD von dem Substrat (Aminoluciferin) der Luciferasereaktion. Nach Oxidation von Aminoluciferin entsteht Lumineszenzlicht, das proportional zum Anteil aktivierter Caspase 3/7 ist und mit einem Luminometer detektiert werden kann (www.promega.de).

Die Zellen wurden in weiße 96 Well-Platten ausgesät und mit Avemar für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf Raumtemperatur abgekühlt und jeweils 100 µL vom Caspase-Glo® 3/7 Reagenz in jede Vertiefung gegeben, gemischt und für 60 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im Luminometer.

3.9 Messung von Reduktionsäquivalenten

3.9.1 Bestimmung des Verhältnisses von NADPH zu NADP⁺

Das intrazelluläre Verhältnis von reduziertem NADPH zu oxidiertem NADP⁺ wurde mit dem NADP/NADPH Quantification Colorimetric Kit von Biovision (Milpitas, USA) bestimmt. Jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden mit 200 µL NADP/NADPH-Extraktionspuffer gelöst und bei -20°C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf Raumtemperatur erwärmt und bei 14 000 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Von der klaren Lösung wurden jeweils 150 µL (50 µL pro Replik) auf eine durchsichtige 96 Well-Platte übertragen. 200 µL aus der gleichen Suspension wurden für 30 Minuten auf 60°C erhitzt. Dabei kam es zum Abbau von NADP⁺, wohingegen NADPH intakt blieb. Von der erhitzten Suspension wurden 150 µL (50 µL pro Replik) auf eine 96 Well-Platte übertragen. Nach 5 Minuten wurden zu jeder Vertiefung 10 µL NADPH-Entwickler dazugegeben und für

2 Stunden inkubiert. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Das Verhältnis von NADPH zu NADP⁺ wird wie folgt berechnet:

$$\text{NADPH} / \text{NADP}^+ = \text{NADPH} / ((\text{NADP}^+ + \text{NADPH}) - \text{NADPH}).$$

Zur Erstellung der Standardkurve wurde aus einer Stammlösung von 10 pmol/μL NADPH folgende Konzentrationen (jeweils zwei Replikate) hergestellt: 20, 40, 60, 80 und 100 pmol/50 μL und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (s. Abb. 3.7 am Beispiel NADH).

3.9.2 Bestimmung des Verhältnisses von NADH zu NAD⁺

Das intrazelluläre Verhältnis von NAD⁺ zu NADH wurde mit dem NAD⁺/NADP Quantification Colorimetric Kit von Biovision (Milpitas, USA) bestimmt. Durchführung und Berechnung des NADH/NAD⁺ Verhältnisses erfolgte wie für NADPH/NADP⁺ beschrieben (Abb. 3.7).

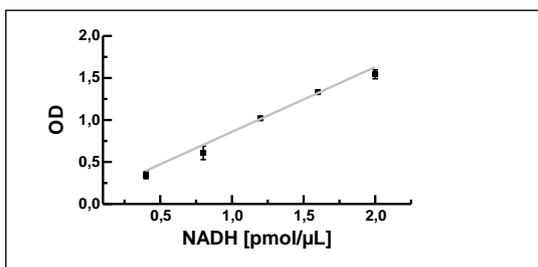


Abb. 3.7: Repräsentative Standardkurve zur Bestimmung von NADH in pmol/μL. Die Daten sind als Mittelwert von zwei Messwerten ± Standardabweichung angegeben.

3.10 Glukose/Laktatmessung

Die Konzentration an Glukose und Laktat im Zellkulturüberstand wurde mit dem Cobas 8000 Modular Analyse System (Roche Diagnostics, Mannheim) durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg bestimmt. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem KV-Assay (Kapitel 3.4) bestimmt. Der Verbrauch an Glukose bzw. die Bildung von Laktat wurde durch Differenzbildung berechnet (Konzentration an Glukose bzw. Laktat vor und nach Inkubation) und auf 10⁴ Zellen normalisiert.

3.11 Western-Blot Untersuchungen

1 x 10⁶ Zellen wurden in einem Reaktionsgefäß bei 250 xg für 5 Minuten zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Das Zellpellet wurde mit RIPA-Puffer (Thermo Fisher, Pierce), der zusätzlich noch Protease- und Phosphatase-Inhibitoren enthielt, lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford Assay (Carls-Roth GmbH, Kat.-Nr. K015.3) bestimmt. Jeweils 30 µg Protein einer Probe wurden pro Geltasche in ein 9 %iges Agarosegel (Amresco, Kat.-Nr. J234) aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 80 Volt für 30 Minuten und bei 120 Volt für 150 Minuten. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran (2 µm Porengröße, Hartenstein, Katalog Nr. BA 83) übertragen. Die verwendeten Antikörper sowie die Sekundärantikörper sind in Tab. 3.2 aufgelistet. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde mit dem Chemilumineszenz-Reagenz ECL (GE Healthcare, Amersham, Kat.-Nr. 2132) gestartet. Der Proteinstandard von Fermentas, Life Science (Kat.-Nr. SM0671) wurde zur Größenbestimmung verwendet.

Tabelle 3.2: Primäre Antikörper für die Western Blot-Analysen.

Zielstruktur	Katalog-Nr.	Verdünnung	Firma
LDH-A	ab47010	1:20.000	abcam
LDH-B	ab75167	1:40.000	abcam
GLUT-1	ab652	1:500	abcam
MCT-1	HPA003324	1:500	Sigma Aldrich
MCT-4	HPA021451	1:10.000	Sigma Aldrich
DT-Diaphorase	AHP2167T	1: 2.000	Bio-Rad Serotec
β-Aktin	Ab8226	1:1.000	abcam
LC3-I/II	MAP1LC3A/B	1:1.000	serotec
Anti-Mouse	074-1806	1:10.000	KPL
Anti-Rabbit	A-10547	1:15.000	invitrogen

Beide sekundären Antikörper wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 2 %iger Magermilchlösung inkubiert.

3.12 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit dem Programm Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), sowie GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego,

CA, USA) statistisch ausgewertet. Dabei wurden folgende statistische Testverfahren angewandt:

- Kolmogorov-Smirnov Test zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung.
- Zweistichproben-t-Test zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben (Mittelwerten) normalverteilter Daten; bei ungleichen Standardabweichungen wurde die Welch-Korrektur angewandt.
- Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich von Mittelwerten nicht normalverteilter Daten.
- Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und anschließende Post-Hoc-Analyse mit dem Tukey-Test zum Vergleich mehrerer Mittelwerte bzw. dem Dunnett-Test zum Vergleich mehrerer Mittelwerte gegenüber dem Kontroll-Mittelwert.

Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Origin V 9.1 (Originlab Corp., Northampton, MA, USA). Die Daten zur Zellzyklusmessung wurden mit dem Programm WinMDI Version 2.9 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung von Zellvitalität und Untersuchungen zum Zellmetabolismus

In der vorliegenden Arbeit wurden die antiproliferativen und antimetabolischen Effekte fermentierter Weizenkeimlinge (Aveamar) an den gastrointestinalen Tumorzelllinien HRT-18 (Karzinomzelllinie des Rektums), 23132/87 (Karzinomzelllinie des Magens) und BxPc-3 (Karzinomzelllinie des Pankreas) und an humanen Fibroblasten untersucht.

Um bei den späteren Untersuchungen einen möglichen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Aveamar (zytotoxisch, zytostatisch bzw. ohne Wirkung) und einer bestimmten Zelleigenschaft (z. B. schnell bzw. langsam wachsend) herstellen zu können, wurde zunächst das Zellwachstum und der Zellmetabolismus der vier Zelllinien untersucht.

Zur Charakterisierung des Zellwachstums wurde für jede Zelllinie die Verdopplungszeit bestimmt. Dazu wurden die Zellen in Kulturmedium für einen Zeitraum von 96 Stunden inkubiert und in Abständen von 24 Stunden die Vitalität der Zellen mit dem Kristallviolett (KV)-Assay bestimmt (Abb. 4.1).

Zur Charakterisierung des Zellmetabolismus wurden der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion bestimmt. Darüber hinaus wurde die Expression der Laktatdehydrogenase und der Transporter MCT-1, MCT-4 und GLUT-1 nachgewiesen (Abb. 4.2 und 4.3).

Die in Aveamar enthaltenen Benzochinone sollen oxidativen Stress auslösen (Kapitel 1.5), weshalb ebenfalls die Fähigkeit der Zellen überprüft wurde, oxidativem Stress entgegenzuwirken.

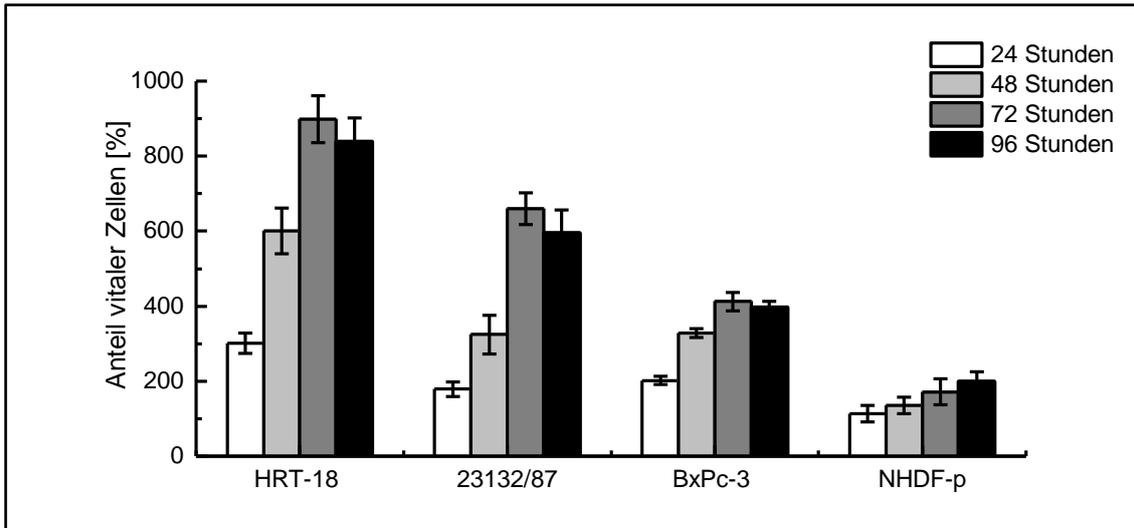


Abb. 4.1: Bestimmung des Zellwachstums. Zellen der Karzinomzelllinien HRT-18, 23132/87 und BxPc-3 wurden für die gesamte Inkubationsdauer in RPMI 1640 Medium (10 % FCS, 11 mmol/L Glukose) und Fibroblasten (NHDF-p) in FGM2 Medium (Kapitel 3.1) inkubiert. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) von 6 Messwerten (technische Replikate) für einen repräsentativen Versuch (von insgesamt 3 unabhängigen Versuchen) angegeben. Veränderungen in der Anzahl vitaler Zellen wurden relativ zur Ausgangszellzahl berechnet. Basierend auf diesen Daten wurden die in Tabelle 4.1 angegebenen Wachstumsraten ermittelt.

Tabelle 4.1: Berechnung der Verdopplungszeiten in Stunden. Die Verdopplungszeiten bzw. Generationszeiten (g) wurden aus den Mittelwerten der in Abb. 4.1 dargestellten Daten für die Kulturdauer von 72 Stunden nach folgender Formel berechnet: $g = \log 2 \times \Delta t / (\log N - \log N_0)$ mit Δt Kulturdauer in Stunden; N_0 Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt Null und N Anzahl der Zellen zum Ablesezeitpunkt.

	HRT-18	23132/87	BxPc-3	NHDF-p ^{*)}
Verdopplungszeit	22,8 \pm 1,7	26,4 \pm 2,1	35,2 \pm 3,4	93,0 \pm 8,0

^{*)} Humane dermale Fibroblasten (Tab. 3.1)

Bei den malignen Zelllinien wies HRT-18 das schnellste und BxPc-3 das langsamste Zellwachstum auf (Abb. 4.1 und Tabelle 4.1). Die Verdopplungszeit für die humanen Fibroblasten war im Vergleich zu den malignen Zelllinien 3- bis 4-fach verlängert.

Nach 72 Stunden war bei den malignen Zellen ein Wachstumsstillstand zu beobachten (Abb. 4.1); vermutlich das Resultat von Nährstoffmangel.

Tumorzellen verfügen über die Fähigkeit, auch in Gegenwart von Sauerstoff Laktat aus Glukose zu bilden (Warburg-Effekt, Kapitel 1.2). Zum Nachweis dieser

Eigenschaft wurden bei den untersuchten Zelllinien die Menge an gebildetem Laktat und der Verbrauch an Glukose für die Kulturdauer von 24 Stunden gemessen (Abb. 4.2). In diesem Zusammenhang wurden die Zellen zudem auf die Expression von LDH und verschiedenen Transportmolekülen für Glukose und Laktat (Glut-1, MCT-1, MCT-4) mit Western Blot-Analysen überprüft (Abb. 4.3).

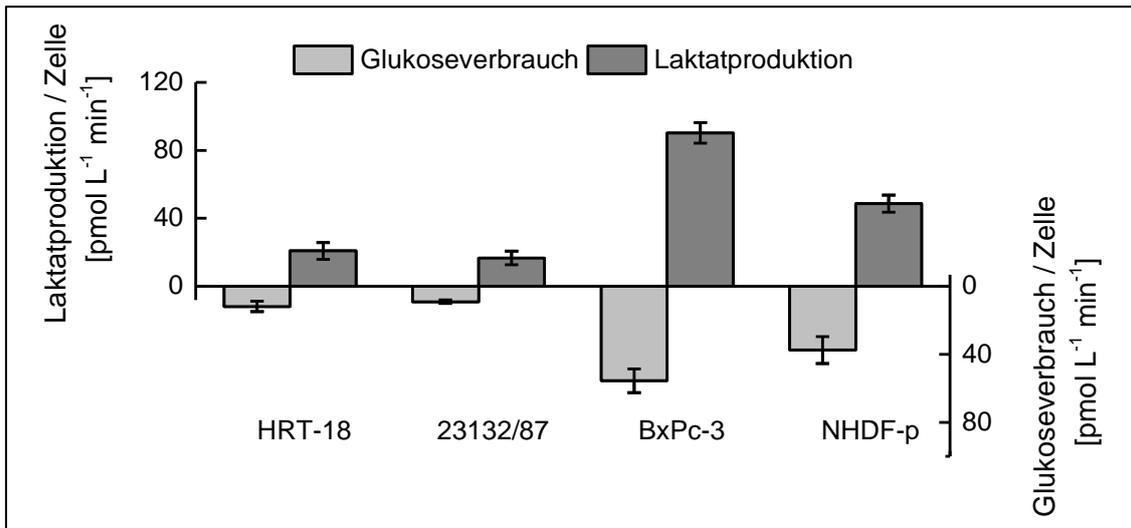


Abb. 4.2: Laktatproduktion und Glukoseverbrauch für die Zelllinien HRT-18, 23132/87, BxPc-3 und Fibroblasten (NHDF-p). Nach 24 Stunden in Kultur wurden die Konzentrationen von Laktat und Glukose im Zellkulturüberstand gemessen, die Differenzen zum jeweiligen Ausgangswert berechnet und die Laktatproduktion bzw. der Glukoseverbrauch pro Zelle angegeben. Die Zellzahlen wurden mittels Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) von 2-3 unabhängigen Messungen angegeben. Die Werte zum Glukoseverbrauch bzw. zur Laktatproduktion sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Berechnungen auf Basis der Daten aus Abb. 4.2 erlauben eine grobe Abschätzung über den Anteil der verbrauchten Glukose, den jede Zelllinie zur Bildung von Laktat (partielle Oxidation von Glukose; Abb. 1.2) und zur vollständigen Oxidation einsetzte (Tabelle 4.2). Nach diesen Berechnungen verbrauchten die Karzinomzellen zum Teil mehr als 90 % der Glukose ausschließlich in der Glykolyse (Tabelle 4.2 und Abb. 4.2). Auch Fibroblasten verbrauchten einen Großteil der verfügbaren Glukose (ca. 65 %) ausschließlich in der Glykolyse (partielle Oxidation) mit anschließender Reduktion von Pyruvat zu Laktat. Aus den Berechnungen wird außerdem ersichtlich, dass Zellen der Zelllinie BxPc-3 deutlich mehr Glukose (18,7 %) durch oxidative Phosphorylierung metabolisierten als Zellen der beiden anderen malignen Zelllinien (6,7 bzw. 11,9 %). Auffällig ist auch, dass

BxPc-3 Zellen einen deutlich erhöhten Glukoseumsatz (um bis das 6-Fache) und eine entsprechend höhere Laktatproduktion aufwiesen als die anderen beiden Karzinomzelllinien. Das biochemische Profil der Zelllinien in Tab. 4.2 bestätigt die bereits von Warburg gezogene Schlussfolgerung (Warburg O, 1955), dass Tumorzellen auf niedrigem Niveau (max. 20 % der Glukose) auch weiterhin zur oxidativen Phosphorylierung in der Lage sind. Mit 35,2 % verbrauchten Fibroblasten einen wesentlich höheren Anteil an Glukose über die oxidative Phosphorylierung als maligne Zellen.

Tabelle 4.2: Biochemisches Profil maligner und nicht-maligner Zellen. Die Tabelle weist Werte für den gemessenen Glukoseverbrauch (GV_{real}), die gemessene Laktatproduktion (LP) und die berechneten Werte für den in die Laktatproduktion gehenden Anteil an partiell oxidiertem Glukose (theoretischer Glukoseverbrauch GV_{theo}) auf. Die Berechnung von GV_{theo} basiert auf dem stöchiometrischen Verhältnis von Glukoseverbrauch zu Laktatbildung von 1:2 (1 Mol Glukose \rightarrow 2 Mol Laktat). Durch Bildung der Differenz von tatsächlichem (GV_{real}) und theoretischem (GV_{theo}) Glukoseverbrauch lässt sich der Anteil an vollständig oxidiertem Glukose ($GV_{real}-GV_{theo}$) berechnen, der über oxidative Phosphorylierung (G_{OXPHOS}) verstoffwechselt wurde ($(GV_{real}-GV_{theo})/GV_{theo} \times 100$). Hinweis: Die thermodynamisch relevante Größen Temperatur und Druck wurden nicht konstant gehalten, weshalb die Messdaten und die hierauf beruhenden Berechnungen als Tendenzen zu werten sind. Die Werte sind in $\mu\text{mol/L}$ pro Minute (Min) für 10^4 Zellen angegeben. NHDF-p: humane dermale Fibroblasten.

	GV_{real} [$\mu\text{mol/L/Min}$]	LP [$\mu\text{mol/L/Min}$]	GV_{theo} [$\mu\text{mol/L/Min}$]	Differenz $GV_{real}-GV_{theo}$ [$\mu\text{mol/L/Min}$]	G_{OXPHOS}
HRT-18	0,118	0,208	0,104	0,014	11,9 %
23132/87	0,090	0,167	0,084	0,006	6,7 %
BxPc-3	0,556	0,903	0,452	0,104	18,7 %
NHDF-p	0,375	0,486	0,243	0,132	35,2 %

Im Rahmen der Untersuchungen zum Energiestoffwechsel der Zellen wurde zudem die Expression der Laktatdehydrogenase (LDH) und der Transportmoleküle (GLUT-1 und MCT) in den Zellen überprüft. LDH ist für den Warburg-Effekt von großer Bedeutung (Vander Heiden MG et al., 2009). Während benigne Zellen nur bei Sauerstoffmangel Pyruvat zu Laktat verstoffwechseln, findet die LDH-katalysierte Reduktion von Pyruvat zu Laktat in malignen Zellen auch bei aeroben Bedingungen statt (Kapitel 1.2). Über die Monocarboxylat-Transporter MCT-1 und MCT-4 wird Laktat aus der Zelle geschleust, um eine intrazelluläre Ansäuerung zu vermeiden (Halestrap A und Price N, 1999).

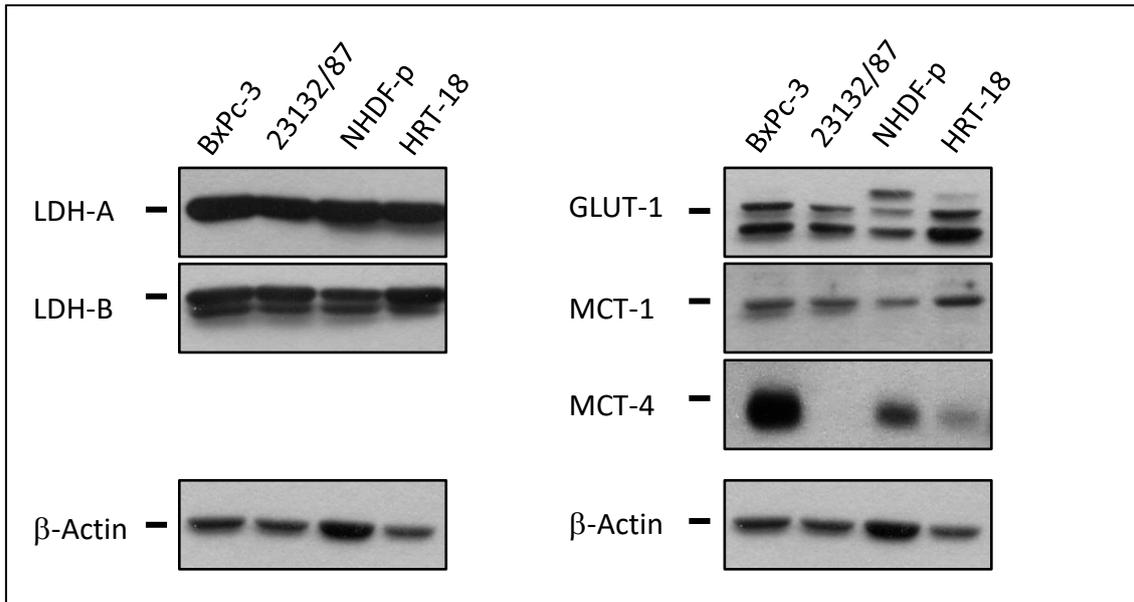


Abb. 4.3: Nachweis der Expression von LDH-A, LDH-B, GLUT-1, MCT-1 und MCT-4. Die Zellen der malignen Zelllinien BxPc-3, 23132/87 und HRT-18 sowie Fibroblasten (NHDF-p) wurden auf die Expression der Enzyme LDH-A und LDH-B sowie auf die Transporter GLUT-1, MCT-1 und MCT-4 untersucht. Die Proteine wurden bei 36 kDA (LDH-A), 37 kDA (LDH-B), 55 kDA (GLUT-1), 53 kDA (MCT-1), 49 kDA (MCT-4) und 43 kDA (β -Actin) detektiert. Die verschiedenen Proteinbanden von GLUT-1 sind auf posttranslationale Modifikationen mit entsprechend unterschiedlichen molekularen Massen für die Isoformen zurückzuführen (Pyla R et al., 2013).

Für die malignen Zellen und Fibroblasten waren Laktatdehydrogenase (LDH-A und LDH-B) und der Glukosetransporter GLUT-1 auf Proteinebene nachzuweisen (Abb. 4.3). Auffallend bei den Monocarboxylat-Transportern war, dass MCT-1 von allen Zellen exprimiert wurde, wohingegen MCT-4 nur in BxPc-3 und in Fibroblasten deutlich und in HRT-18 schwach nachzuweisen war.

Zum Schutz vor Benzochinon-induziertem oxidativem Stress verfügt die Zelle über verschiedene antioxidative Schutzsysteme, wozu auch die DT-Diaphorase gehört (Abb. 1.8), die insbesondere den Chinon-induzierten oxidativen Stress verringert (Lind C et al., 1982). Die DT-Diaphorase katalysiert die Zwei-Elektronen-Reduktion vom Chinon zum Hydrochinon und verhindert so die Bildung reaktiver Semichinonradikale (Abb. 1.8). Für diese Reaktion liefern die Kofaktoren Nikotinamiddinukleotidphosphat (NADP) bzw. Nikotinamiddinukleotid (NAD) den notwendigen Wasserstoff, weshalb sie in reduzierter Form vorliegen müssen (Brunmark A et al., 1987).

Im Western Blot wurde die DT-Diaphorase, das vor Chinon-induziertem oxidativem Stress schützende Enzym, für drei der vier untersuchten Zelllinien nachgewiesen (Abb. 4.4). In Fibroblasten und den beiden malignen Zelllinien HRT-18 und 23132/87 war DT-Diaphorase vorhanden. Dagegen fehlte das Enzym in den BxPc-3 Zellen (Abb. 4.4 B); auch die Expression DT-Diaphorase-spezifischer mRNA war in BxPc-3 Zellen herunterreguliert (Abb. 4.4 A).

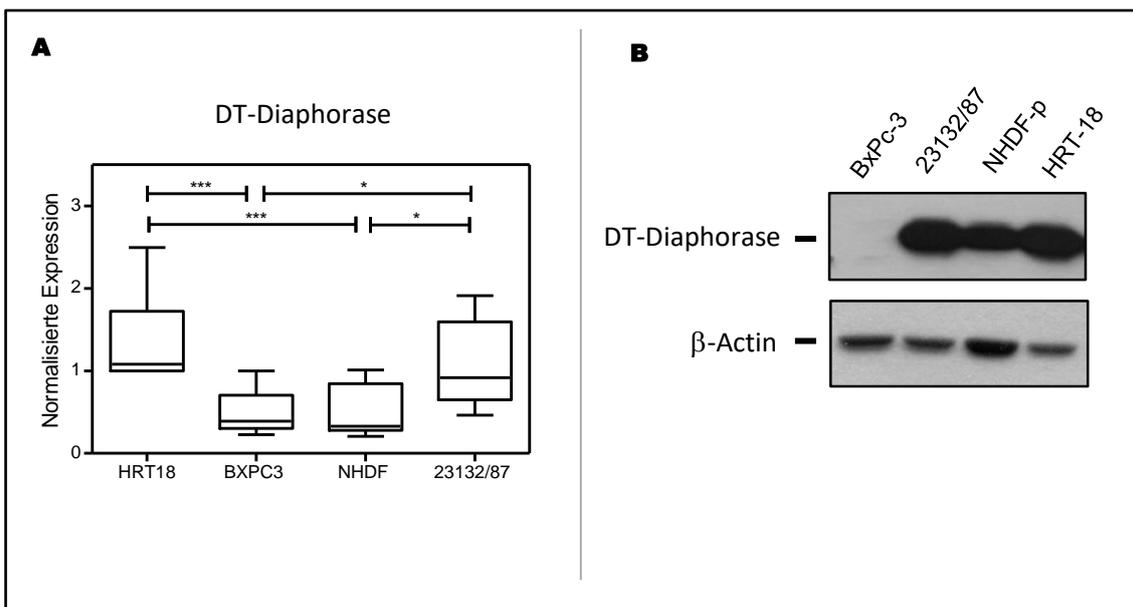


Abb. 4.4: Nachweis der DT-Diaphorase in den untersuchten Zelllinien auf mRNA- (A) und Proteinebene (B). Die Zellen wurden für 24 Stunden in Medium inkubiert und für RT-qPCR Analysen (A) bzw. Western Blot Untersuchungen (B) aufbereitet. Die Daten der RT-qPCR sind als normalisierte Expression in Form eines Box Plots nach Tukey mit Median (Querstrich), oberes und unteres Quartil (obere und untere Begrenzung der Box) und Antennen («Whiskers») angegeben. Die molekulare Masse der DT-Diaphorase liegt bei 28 kDA, die von β -Actin bei 43 kDA. Die RT-qPCR wurde wie beschrieben durchgeführt (Kämmerer U et al., 2015). *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001.

Weiterhin wurde das Verhältnis von reduzierter zu oxidiert Form der beiden intrazellulären Kofaktoren NAD und NADP bestimmt. Bei Oxidationsprozessen fungiert NAD^+ als wichtiger Elektronenakzeptor und daher wird in der Zelle in aller Regel ein Verhältnis für NADH/NAD^+ von kleiner 1 vorgefunden (Lin SJ und Guarente L, 2003). Für NADP dagegen, der Kofaktor für reduzierende Biosynthesen, liegt intrazellulär ein $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ -Verhältnis von größer 1 vor (Veech R et al., 1969). Die untersuchten malignen Zellen und Fibroblasten wiesen ein

NADH/NAD⁺-Verhältnis von kleiner 1 auf, während ein NADPH/NADP⁺-Verhältnis von größer 1 in allen malignen Zelllinien gefunden wurde (Abb. 4.5). Am deutlichsten war letzteres für die Zelllinie HRT-18 nachzuweisen, bei der das NADPH/NADP⁺-Verhältnis einen Wert von 28 annahm (Abb. 4.5 B).

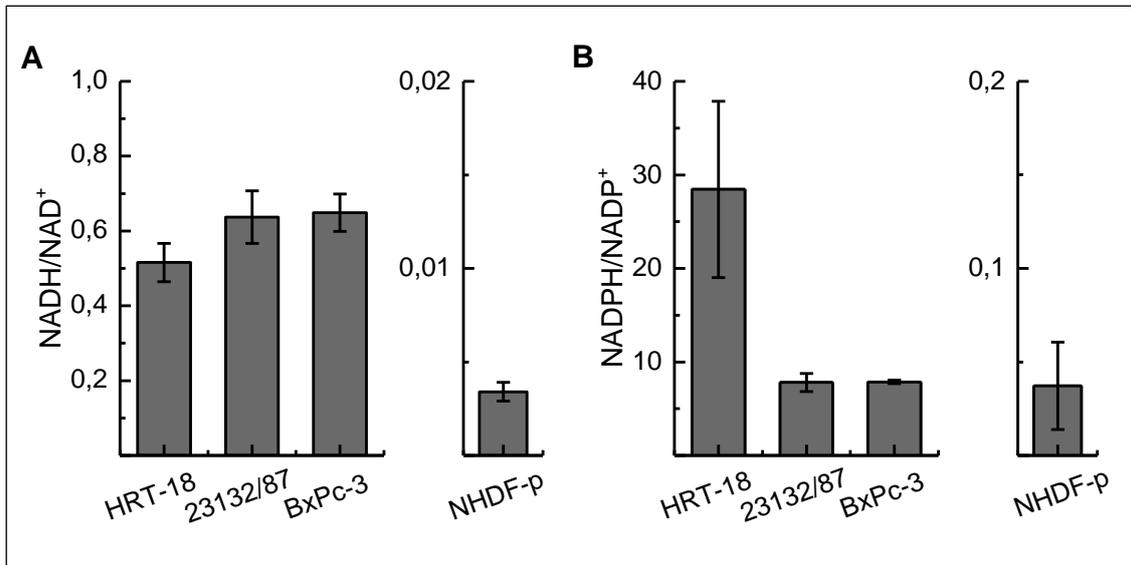


Abb. 4.5: Intrazelluläres Verhältnis von NADH/NAD⁺ bzw. NADPH/NADP⁺. Das Verhältnis von NADH/NAD⁺ bzw. NADPH/NADP⁺ wurde für die Zelllinien HRT-18, 23132/87, BxPc-3 und NHDF-p nach 24 Stunden in Kultur bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung (Fehlerbalken) für 3 repräsentative technische Replikate angegeben.

Für die Fibroblasten war auffällig, dass für beide Kofaktoren das Verhältnis deutlich auf Seiten der oxidierten Form lag. Das NADH/NAD⁺-Verhältnis in Fibroblasten betrug ca. 0,004, wohingegen maligne Zellen ein Verhältnis zwischen 0,5 und 0,6 aufwiesen. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass Fibroblasten im Vergleich zu malignen Zellen einen gesteigerten oxidativen Stoffwechsel aufweisen, wodurch das NADH/NAD⁺-Verhältnis kleiner bleibt als das von malignen Zellen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Fibroblasten deutlich mehr oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung betreiben als maligne Zellen (Tabelle 4.2).

4.2 Charakterisierung der antiproliferativen Effekte von Avemar

Ziel war es, diejenige Avemar-Konzentration zu bestimmen, die bei allen drei untersuchten Zelllinien einen signifikanten antiproliferativen Effekt aufweist. Hierzu wurden Zellen der Zelllinien HRT-18, 23132/87 und BxPc-3 mit verschiedenen Konzentrationen an Avemar (0,1; 1; 10 mg/mL) für 24 Stunden inkubiert und der Anteil vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt.

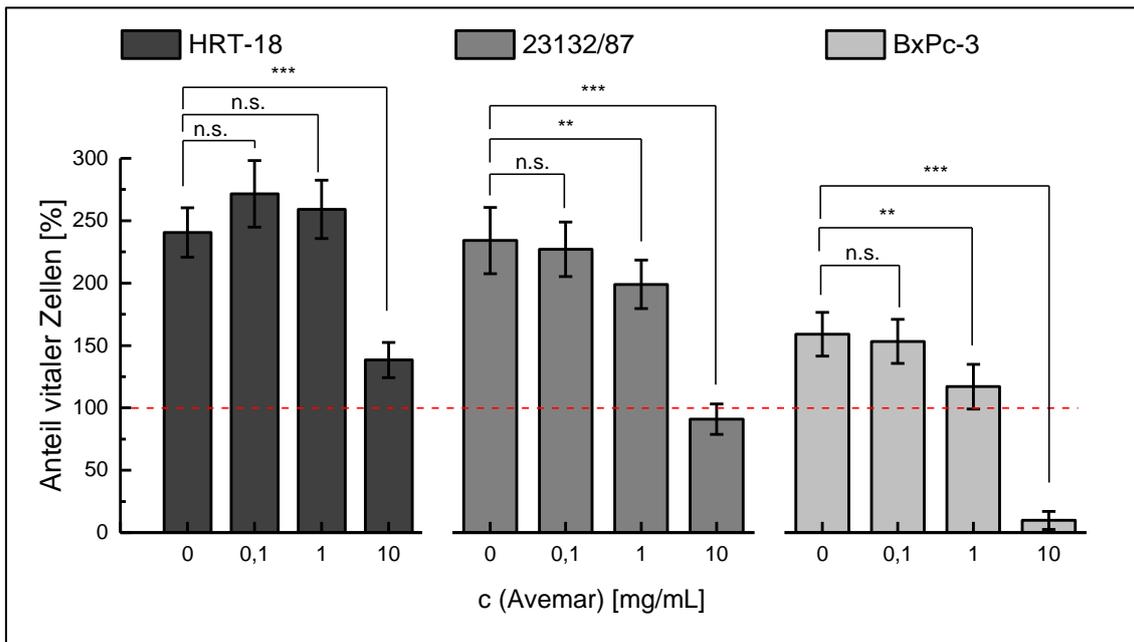


Abb. 4.6: Der antiproliferative Effekt von Avemar an Zellen der Zelllinien HRT-18, 23132/87 und BxPc-3. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen (c) an Avemar für 24 Stunden inkubiert und anschließend der Anteil vitaler Zellen mit dem KV-Assay bestimmt. Die gestrichelte Linie entspricht der Ausgangszellzahl. Veränderungen in der Anzahl vitaler Zellen wurden relativ zur Ausgangszellzahl berechnet. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) von 4-6 Messwerten angegeben. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 zwischen behandelten (Avemar) und unbehandelten Zellen.

Avemar in der Konzentration von 10 mg/mL wies einen eindeutigen antiproliferativen Effekt bei HRT-18 und 23132/87 Zellen auf und war für BxPc-3 Zellen zytotoxisch. Kein antiproliferativer Effekt war für Avemar-Konzentrationen von 0,1 bzw. 1 mg/mL nachzuweisen (Abb. 4.6). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Avemar für die nachfolgenden Untersuchungen in einer Konzentration von 10 mg/mL eingesetzt.

Es wurden zunächst die antiproliferativen Effekte von Avemar für eine Inkubationszeit von 12 bzw. 24 Stunden untersucht (Abb. 4.7).

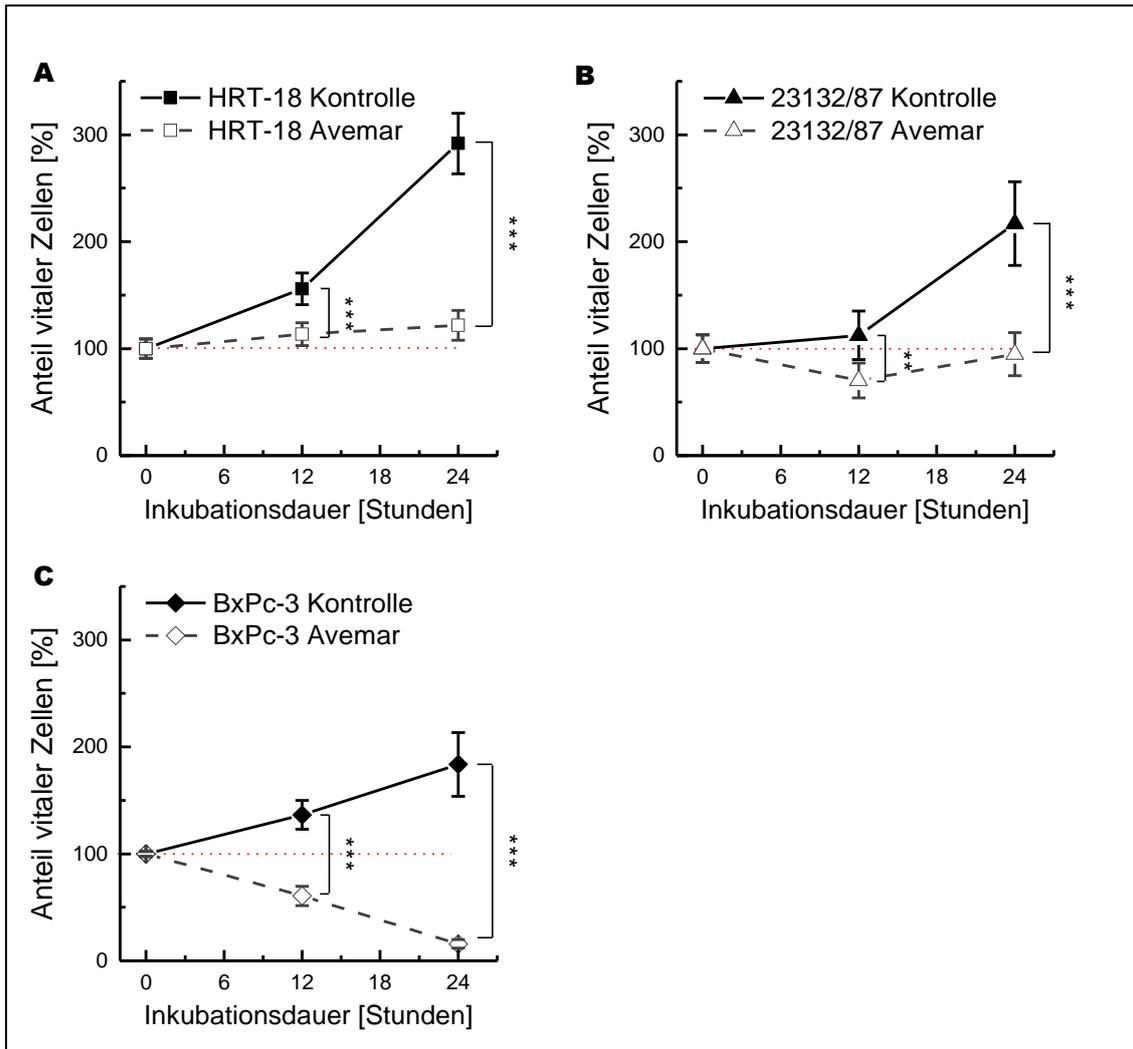


Abb. 4.7: Antiproliferative Effekte von Avemar für Inkubationszeiten von 12 und 24 Stunden. Dargestellt ist der Anteil vitaler Zellen der Zelllinien HRT-18 (A), 23132/87 (B) und BxPc-3 (C) für unbehandelte (Kontrolle) und mit Avemar-behandelte Kulturen. Hierzu wurden die Zellen in Kulturmedium ohne und mit Avemar (10 mg/mL) für 12 und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Anteil vitaler Zellen mit dem KV-Assay bestimmt. Die gestrichelte Linie zeigt die prozentuale Ausgangszellzahl an. Veränderungen in der Anzahl vitaler Zellen wurden relativ zur Ausgangszellzahl berechnet. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) von 4-6 Messwerten angegeben. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 zwischen behandelten (Avemar) und unbehandelten Zellen.

In Gegenwart von Avemar verringerte sich die Zunahme vitaler HRT-18 Zellen bereits innerhalb von 12 Stunden signifikant (Abb. 4.7 A). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden war der antiproliferative Effekt von Avemar eindeutig

nachzuweisen. Während der Anteil vitaler Zellen in der unbehandelten Kontrollgruppe um 192 % zunahm, nahm der Anteil vitaler Zellen unter Avemar lediglich um 22 % zu (Abb. 4.7 A). Demnach blieb die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation grundsätzlich erhalten, doch war das Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle deutlich verzögert bzw. gehemmt.

Bei der Zelllinie 23132/87 blieb der Anteil vitaler Zellen durch Inkubation mit Avemar nahezu konstant (Abb. 4.7 B). Avemar induzierte in diesen Zellen eine Zytostase. Im Vergleich dazu zeigten die unbehandelten Zellen eine Zunahme der Zellzahl um 105 % nach 24 Stunden.

Die 24-stündige Inkubation der Zelllinie BxPc-3 mit Avemar führte zu einer Abnahme vitaler Zellen um 84 % von der Aussaat (Abb. 4.7 C). Somit wirkte Avemar auf BxPc-3-Zellen eindeutig zytotoxisch. Im Vergleich dazu nahm bei der unbehandelten Kontrolle der Anteil vitaler Zellen um 83 % zu.

Somit scheinen schnell wachsende Zellen wie HRT-18 (Tabelle 4.1) nicht per se empfindlicher auf die Inkubation mit Avemar zu reagieren als langsam wachsende Zellen. Die Ergebnisse zum antiproliferativen Effekt von Avemar auf die untersuchten Zelllinien sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Beschreibung der Wirkqualität des antiproliferativen Effekts von Avemar bei den Zelllinien HRT-18, 23132/87 und BxPc-3. Die Festlegung der Wirkqualität von Avemar erfolgte nach einer Inkubation von 24 Stunden. Der Einfluss von Avemar auf die Anzahl vitaler Zellen ist bezogen auf die Aussaat.

	Einfluss auf die Anzahl vitaler Zellen	Wirkqualität
HRT-18	Zunahme der Zellzahl um mehr als 15 %, aber unterhalb der Wachstumskontrolle	Wachstumsverzögert
23132/87	Veränderung der Zellzahl um nicht mehr als 15 %	Zytostatisch
BxPc-3	Verringerung der Zellzahl um mehr als 15 %	Zytotoxisch

Im Anschluss wurde der antiproliferative Langzeiteffekt von Avemar auf die Vitalität der Zelllinien HRT-18 und 23132/87 für Inkubationszeiten von über 24 Stunden untersucht (Abb. 4.8).

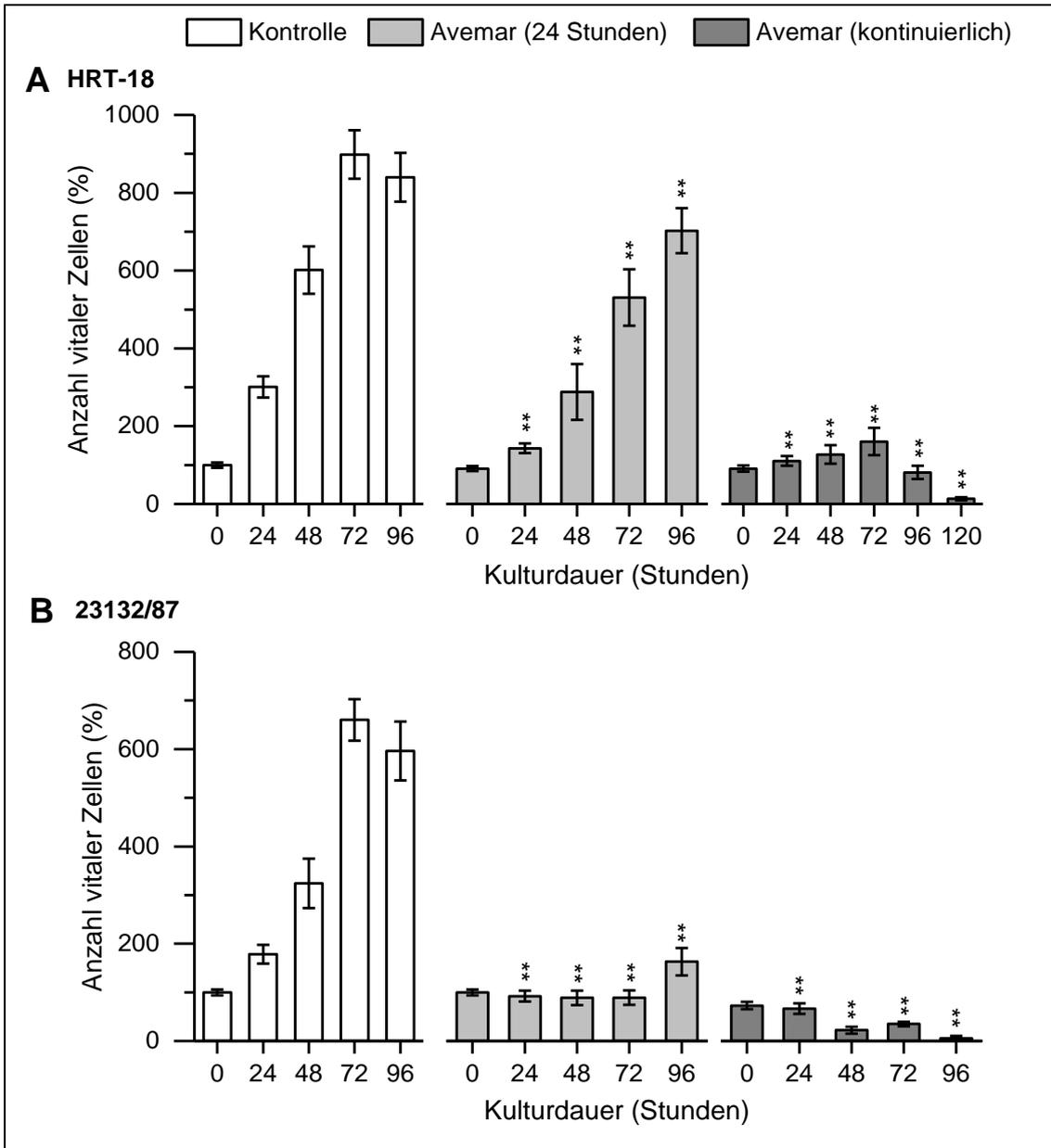


Abb. 4.8: Antiproliferative Effekte von Avemar für Inkubationszeiten von mehr als 24 Stunden. Dargestellt ist der Anteil vitaler Zellen unbehandelter (Kontrolle) und Avemar-behandelter Zellen der Zelllinien HRT-18 (A) und 23123/87 (B). Die Zellen wurden entweder mit Avemar (10 mg/mL) für 24 Stunden inkubiert und anschließend mit Avemar-freiem Medium für die angegebenen Zeiten weiter inkubiert (Avemar 24 Stunden) oder über den gesamten Zeitraum ohne Mediumwechsel mit Avemar inkubiert (Avemar kontinuierlich). Zur Kontrolle wurden die Zellen für die gesamte Versuchsdauer in Zellkulturmedium ohne Avemar kultiviert. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem KV-Assay bestimmt. Veränderungen in der Anzahl vitaler Zellen wurden relativ zur Ausgangszellzahl berechnet. Die Daten sind als Mittelwert von 3-6 Messwerten mit Standardabweichung (Fehlerbalken) angegeben. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001 zwischen behandelten (Avemar) und unbehandelten Zellen.

Bei der Langzeitinkubation war von Interesse, ob der zytostatische bzw. wachstumsverzögernde Effekt von Avemar reversibel ist. Aufgrund der bereits innerhalb von 24 Stunden nachweisbaren starken zytotoxischen Wirkung von Avemar auf Zellen der Zelllinie BxPc-3 (Abb. 4.7 C) wurde der Langzeiteffekt bei diesen Zellen nicht untersucht.

Die Variation der Inkubationsdauer mit Avemar ließ folgende antiproliferative Effekte erkennen: (1) Wurde Avemar nach 24 Stunden gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht, so nahm der Anteil vitaler Zellen bei HRT-18 Kulturen wieder kontinuierlich zu. Die Zunahme vitaler Zellen war dann jedoch geringer als die Zunahme der Kontrollzellen. Für 23132/87 Zellen setzte die Proliferation nach Entfernen von Avemar erst nach 72 Stunden wieder ein. Die Zellzahlzunahme betrug bei 23132/87 Zellen weniger als 200 % für die gesamte Kulturdauer (2). Die Langzeitkultur mit Avemar war für Zellen beider Zelllinien zytostatisch bzw. zytotoxisch (Abb. 4.8). Bei HRT-18 Zellen war der zytotoxische Effekt zwischen 96 und 120 Stunden und bei Zellen der 23132/87 Zelllinie zwischen 48 und 72 Stunden in Kultur zu beobachten.

Zusammenfassung Kapitel 4.2:

(1) Avemar und die Pankreaskarzinomzelllinie BxPc-3: Avemar induziert einen starken zytotoxischen Effekt in BxPc-3 Zellen innerhalb von 24 Stunden mit einer Abnahme vitaler Zellen um mehr als 80 % (Abb. 4.7 C).

(2) Avemar und die Magenkarzinomzelllinie 23132/87 und die Rektumkarzinomzelllinie HRT-18 (»Kurzeiteffekt«): Avemar induziert einen zytostatischen bzw. wachstumsverzögernden Effekt bei Zellen dieser Zelllinien innerhalb von 24 Stunden (Abb. 4.7 A, B).

(3) Avemar und die Magenkarzinomzelllinie 23132/87 und die Rektumkarzinomzelllinie HRT-18 (»Langzeiteffekt«): Die Langzeitkultur mit Avemar induziert eindeutig zytotoxische Effekt bei Zellen beider Zelllinien. Wird Avemar nach 24 Stunden aus den Kulturen entfernt, so nimmt der Anteil vitaler Zellen wieder zu (Abb. 4.8). In der Stärke der Zunahme vitaler Zellen unterscheiden sich HRT-18 und 23132/87 Zellen deutlich.

4.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Avemar

Im Folgenden wurden die Mechanismen, die den antiproliferativen Effekten von Avemar zugrunde liegen, an den malignen Zelllinien HRT-18, 23132/87 und BxPc-3 untersucht.

4.3.1 Avemar und DMBQ vermittelte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Zur Klärung der Bedeutung der in Avemar enthaltenen 2,6-Dimethylbenzochinone (DMBQ) für den antiproliferativen Effekt, wurde die Wirkung von Avemar und der Reinsubstanz DMBQ miteinander verglichen. Da DMBQ über die Induktion von oxidativem Stress Zytotoxizität auslösen (Kapitel 1.3), wurde ebenfalls die durch DMBQ bzw. Avemar induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gemessen. Die Konzentration an DMBQ wurde dabei so gewählt, dass sie äquimolar zur Konzentration der Benzochinone in Avemar war; sie betrug 24 $\mu\text{mol/L}$ (zur Berechnung s. Kapitel 3.3.2).

Sowohl DMBQ als auch Avemar induzierten innerhalb von 24 Stunden einen zytotoxischen Effekt in BxPc-3 Zellen (Abb. 4.9 A). Zudem ließ sich für beide Substanzen die Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies in BxPc-3 Zellen nachweisen. Dabei lösten DMBQ einen bis zu 20-fachen und Avemar einen bis zu 40-fachen Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies aus (Abb. 4.10 A). Die Korrelation zwischen Zytotoxizität und dem Anteil gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies lässt vermuten, dass sowohl die Avemar- als auch DMBQ-vermittelte Zytotoxizität bei BxPc-3 Zellen auf oxidativen Stress in der Zelle zurückzuführen ist.

Bei den Zelllinien HRT-18 und 23132/87 induzierte Avemar ebenfalls die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, doch war ihr Anteil in diesen Zellen im Vergleich zur Zelllinie BxPc-3 deutlich geringer (Abb. 4.10), so dass vermutlich kein bzw. ein schwacher oxidativer Stress in den Zellen induziert wurde.

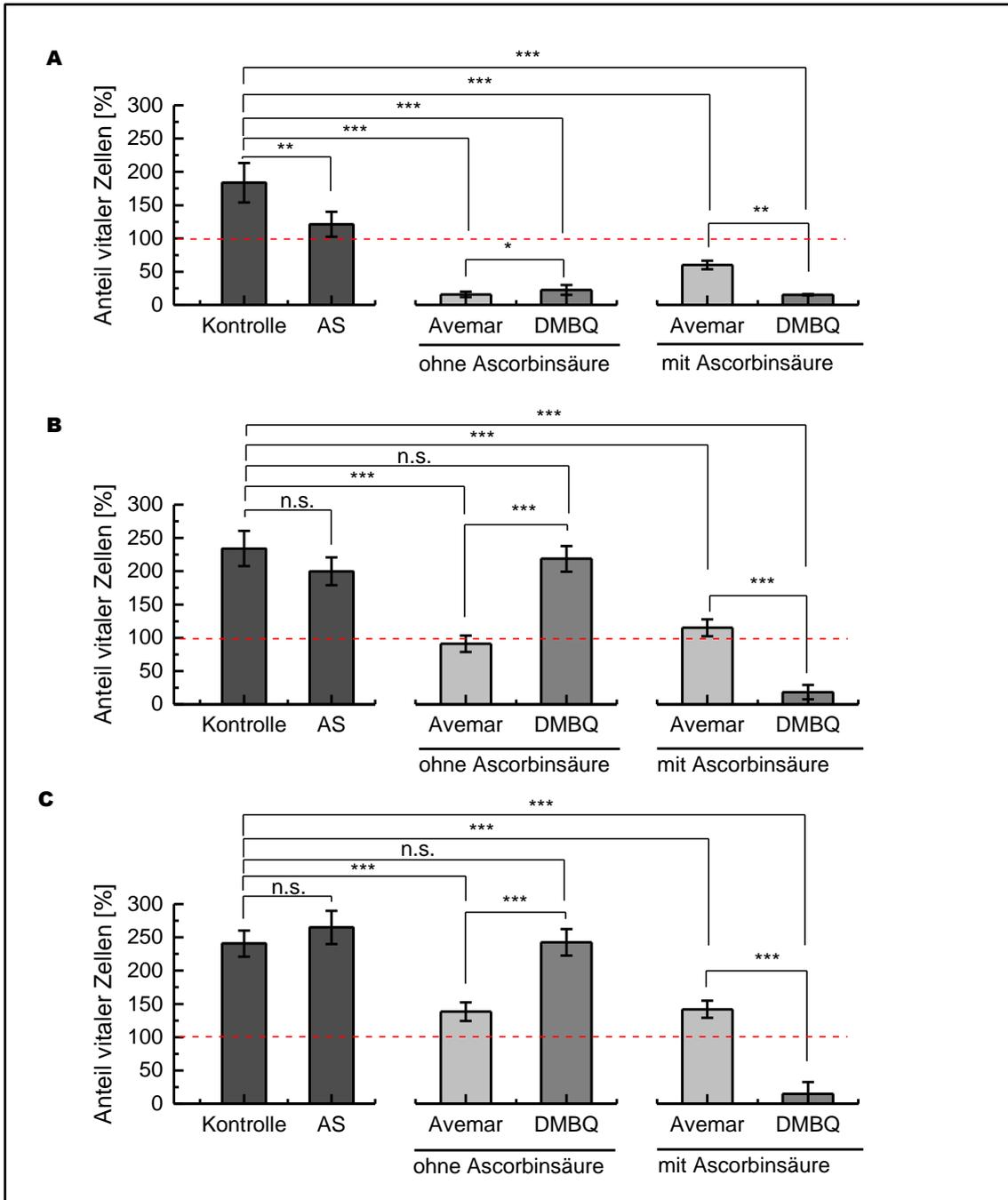


Abb. 4.9: Antiproliferative Effekte von Avemar und DMBQ an Zellen der Karzinom-Zelllinien BxPc-3 (A), 23132/87 (B) und HRT-18 (C). Die Zellen wurden mit Medium (Kontrolle), Ascorbinsäure (AS), Avemar und DMBQ inkubiert. Die gestrichelte Linie entspricht der Ausgangszellzahl. Veränderungen in der Anzahl vitaler Zellen wurden relativ zur Ausgangszellzahl berechnet. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) von 4-6 Messwerten angegeben. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001, n.s. (nicht signifikant) P >0.05.

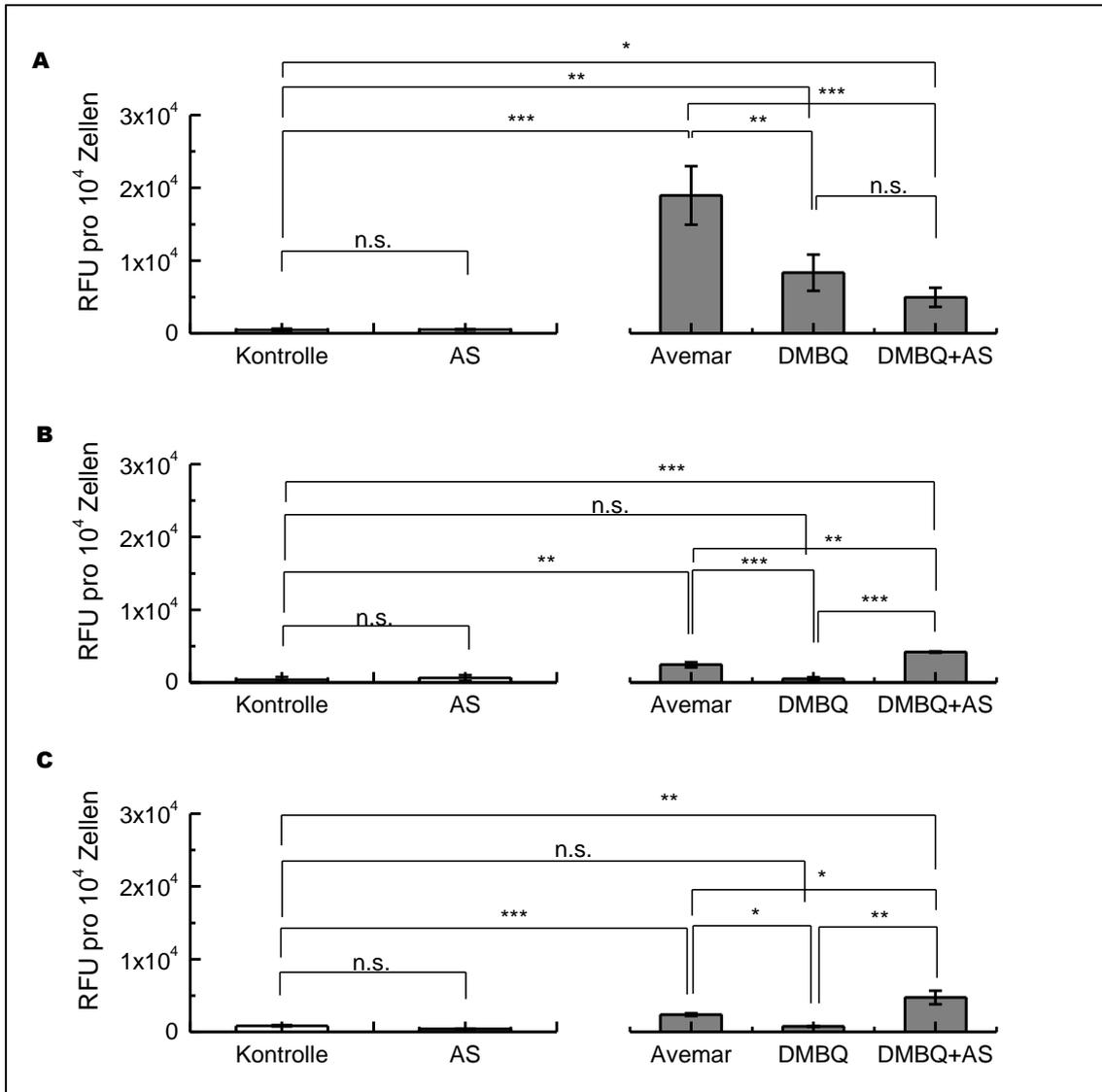


Abb. 4.10: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Avemar und DMBQ in Zellen der Karzinom-Zelllinien BxPc-3 (A), 23132/87 (B) und HRT-18 (C). Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Medium (Kontrolle), Ascorbinsäure, Avemar und DMBQ inkubiert. Die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurde mit dem DCFH-DA Assay detektiert und auf 10.000 Zellen normiert. Hierzu wurde die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung von 3-6 Messwerten in RFU («relative fluorescence units») angegeben. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001, n.s. (nicht signifikant) P >0.05.

Auffällig bei diesen Experimenten war, dass sowohl DMBQ als auch Avemar für BxPc-3 Zellen auch ohne die Zugabe des Reduktionsmittels Ascorbinsäure zytotoxisch waren (Abb. 4.9 A). Bei 23132/87 und HRT-18 waren DMBQ erst nach Zugabe des Reduktionsmittels Ascorbinsäure zytotoxisch (Abb. 4.9 B und C). Gleichmaßen wurde eine durch DMBQ vermittelte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ausschließlich in Anwesenheit von Ascorbinsäure beobachtet

(Abb. 10 B und C). Zytotoxische Effekte durch Ascorbinsäure wurden im Vorfeld für alle Zelllinien ausgeschlossen (Abb. 4.9 A, B und C).

4.3.2 Untersuchungen zur Apoptose

Die zytotoxische Wirkung von Avemar auf BxPc-3 Zellen (Abb. 4.9) steht in Zusammenhang mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Abb. 4.10). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde untersucht, ob der durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöste oxidative Stress Apoptose induziert. Hierzu wurde die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7, die für die Induktion von Apoptose eine wichtige Rolle spielen (Kapitel 1.4), untersucht. BxPc-3 Zellen wurden für 2 Stunden mit Avemar inkubiert.

Die Ergebnisse mit dem Aktivitätsassay (Kapitel 3.8) lassen keine durch Avemar induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 nach 2 Stunden Inkubation erkennen (Abb. 4.11). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der durch Avemar ausgelöste oxidative Stress das apoptotische Programm in BxPc-3 Zellen erst zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert. Ob der starke oxidative Stress zum nekrotischen Zelltod (Kapitel 1.4) führt, ist zudem nicht auszuschliessen, da diese Form des Zelltods in Zusammenhang mit oxidativem Stress nicht untersucht wurde.

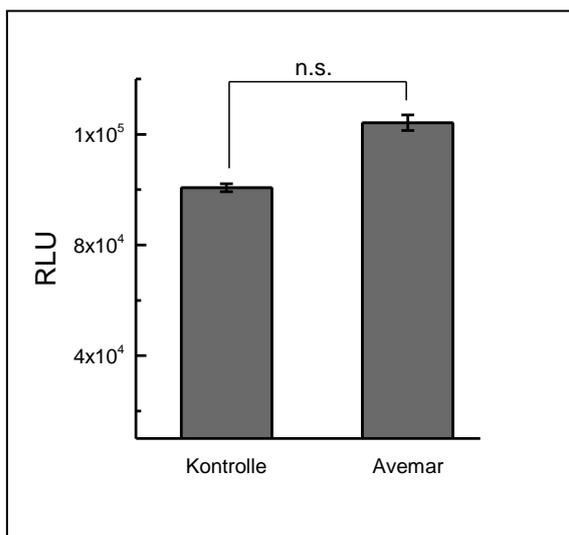


Abb. 4.11: Bestimmung von Caspase 3 und 7 in den Pankreaskarzinomzellen BxPc-3 unter Avemareinfluss. Die Konzentration von Avemar betrug 10 mg/mL. Zur Kontrolle wurden BxPc-3 Zellen in Kulturmedium ohne Avemar inkubiert (Inkubationsdauer: 2 Stunden). Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 wurde in einem Lumineszenz-Assay der Firma Promega ermittelt (Kapitel 3.5). RLU: »relative fluorescence units«; n.s. (nicht signifikant) $P > 0.05$.

Zusammenfassung Kapitel 4.3.1 und 4.3.2:

Der durch Avemar und DMBQ bei BxPc-3 Zellen ausgelöste zytotoxische Effekt verringert den Anteil vitaler Zellen um mehr als 50 % innerhalb von 24 Stunden (Abb. 4.7). Der Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies lässt vermuten, dass der zytotoxische Effekt auf der Induktion von oxidativem Stress beruht (Abb. 4.10). Der antiproliferative Effekt von DMBQ in 23132/87 und HRT-18 Zellen ist abhängig davon, ob Ascorbinsäure als Reduktionsmittel vorliegt oder nicht (zur Bedeutung der Ascorbinsäure für den zytotoxischen Effekt von DMBQ s. Abb. 1.8). DMBQ wirkt ausschließlich in Gegenwart von Ascorbinsäure zytotoxisch, wohingegen Avemar unabhängig vom Reduktionsmittel zytostatische bzw. wachstumsverzögernde Effekte auslöst (Abb. 4.9).

4.3.3 Einfluss von Avemar auf den Zellzyklus

Der antiproliferative Effekt von Avemar induzierte in Zellen der Zelllinie 23132/87 eine Zytostase und in Zellen der Zelllinie HRT-18 eine Wachstumsverzögerung (Abb. 4.7 und Tabelle 4.3). Mit der Durchflusszytometrie (FACS) wurde für beide Zelllinien ein möglicher Einfluss von Avemar auf den Zellzyklus untersucht. Dazu wurden die Zellen für 24 Stunden in Kulturmedium mit und ohne Avemar kultiviert und anschließend wurde der zelluläre DNA-Gehalt gemessen.

Bei Zellen der Rektumkarzinomzelllinie HRT-18 löste Avemar keine Verschiebung der Zellzyklusphasen aus (Abb. 4.12 A). Die Verteilung der Zellen auf G_0/G_1 -, S- und G_2/M -Phase entsprach der der Wachstumskontrolle. Bei den Magenkarzinomzellen 23132/87 dagegen kam es durch Avemar zu einer Anreicherung der Zellen in der G_2/M Phase (Abb. 4.12 B). Der Anteil der Zellen, der sich in dieser Phase befand, nahm von 15 % auf 27 % zu. Dementsprechend kam es bei der G_0/G_1 - und der S-Phase zu einer Abnahme der in diesen Phasen befindlichen Zellen. Das Ergebnis der Zellzyklusmessungen bestätigt die Ergebnisse der Wachstumsversuche (Kapitel 4.2): bei 23132/87 Zellen wurde eine Zytostase beobachtet und bei HRT-18 Zellen lediglich ein verzögertes Wachstum.

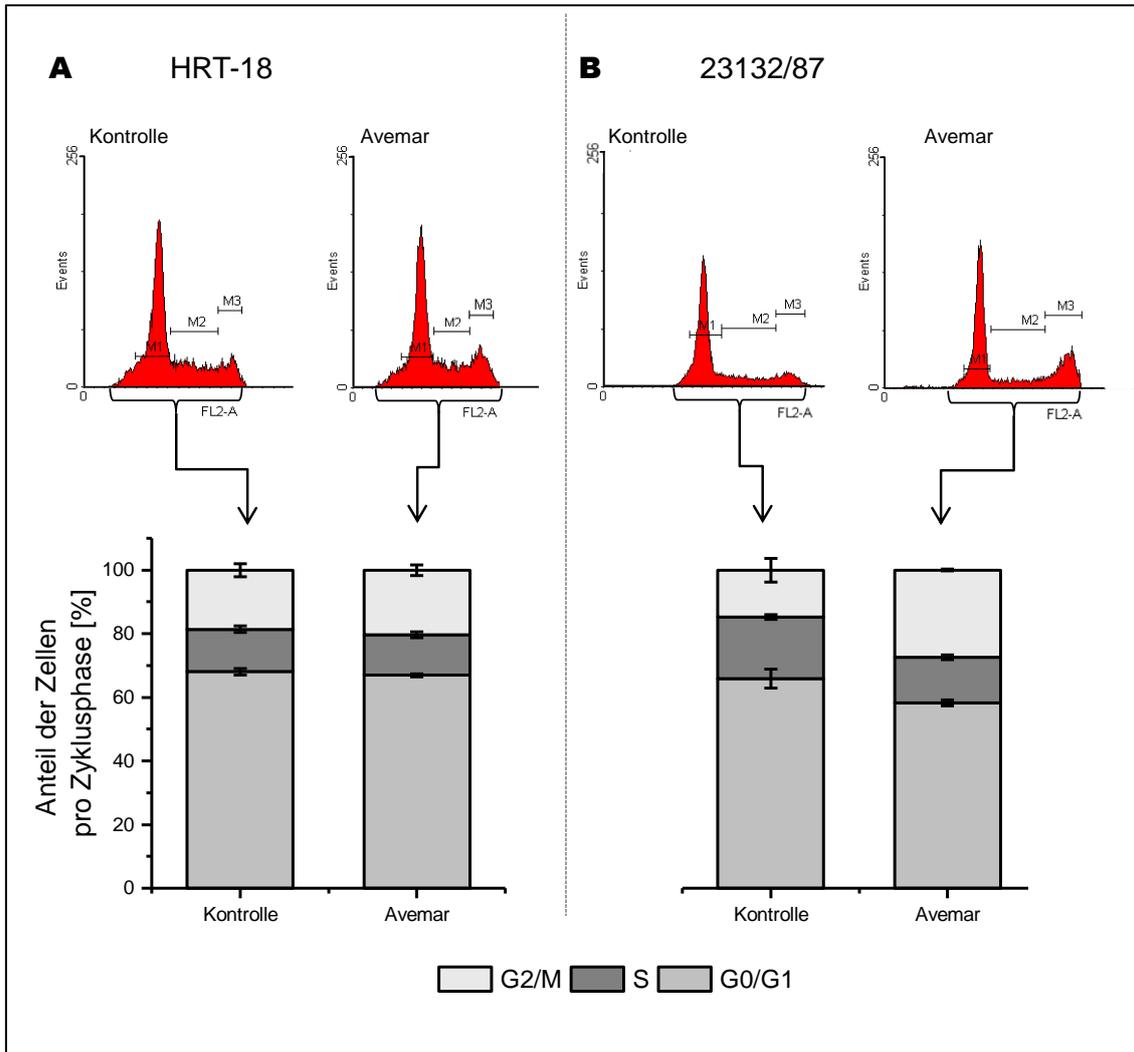


Abb. 4.12: Einfluss von Avemar auf die Zellteilung bei HRT-18 und 23132/87 Zellen. Kontrollzellen wurden in Medium ohne Avemar kultiviert. In der oberen Reihe dargestellt sind die durchflusszytometrischen Messungen als Histogramme. Es sind zwei Peaks zu erkennen, wobei der erste Peak den Zellen mit einfachem DNA-Gehalt (M1=G₀/G₁-Phase) und der zweite Peak den Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt (M3=G₂/M-Phase) entspricht. Dazwischen liegen die Zellen, in denen die DNA repliziert wird (M2=S-Phase). Unten dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen. Die prozentuale Verteilung berechnet sich aus den Bereichen M1-M3 der Histogramme. Die Daten in Prozent sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) von zwei unabhängigen Versuchen angegeben.

4.3.4 Avemar-induzierte metabolische Effekte

Ein Zellzyklusarrest kann auf einen Mangel des zellulären Energieträgers ATP hindeuten (Sweet S und Singh G, 1995). Der bei Avemar-behandelten 23132/87-Zellen beobachtete G₂/M-Arrest lässt vermuten, dass Avemar den Energiestoffwechsel dieser Zellen beeinflusst. Da Glukose ein wesentlicher Energieträger für den zellulären Stoffwechsel darstellt, ist anzunehmen, dass der Einfluss von Avemar in erster Linie den Glukosestoffwechsel betrifft. Demzufolge wurde der Verbrauch an Glukose und die Bildung von Laktat (Kapitel 1.2) in Avemar-behandelten Zellen und Kontrollzellen gemessen. Da ein eingeschränkter Stoffwechsel nicht nur den zellulären ATP-Gehalt beeinflusst, sondern auch den Anteil reduzierter Reduktionsäquivalente verringert, wurde zusätzlich das Verhältnis von reduzierter zu oxidierter Form (NADH/NAD⁺) von NAD bestimmt. Für diese Untersuchungen wurden 23132/87-Zellen mit HRT-18 Zellen verglichen. Avemar wirkte bei 23132/87-Zellen zytostatisch und bei HRT-18 Zellen wachstumsverzögernd (Abb. 4.7 und Tab. 4.3). Durch den Vergleich der Ergebnisse für 23132/87 und HRT-18 Zellen lässt sich abschätzen, ob Zytostase und Wachstumsverzögerung auf identischen zellulären Ereignissen beruht.

Der für Avemar-behandelte 23132/87 Zellen nachgewiesene Zellzyklusarrest ging mit einer Verringerung des ATP-Gehalts um 70 % einher (Abb. 4.13 A). Dagegen beeinflusste Avemar den Anteil an zellulärem ATP in HRT-18 Zellen nicht (Abb. 4.13 A). Die Ergebnisse zum ATP-Gehalt bei 23132/87 und HRT-18 Zellen lassen vermuten, dass diese in Bezug zum beobachteten Unterschied beim Avemar-induzierten antiproliferativen Effekt (Kapitel 4.2) stehen: Während die bei 23132/87 Zellen beobachtete Zytostase mit einem verringerten ATP-Gehalt einher ging, wiesen HRT-18 Zellen, die in Gegenwart von Avemar lediglich verzögert wuchsen, einen unveränderten ATP Gehalt auf. Die bei HRT-18 durch Avemar induzierte Wachstumsverzögerung war somit vermutlich nicht Ursache eines Mangels an zellulärem ATP.

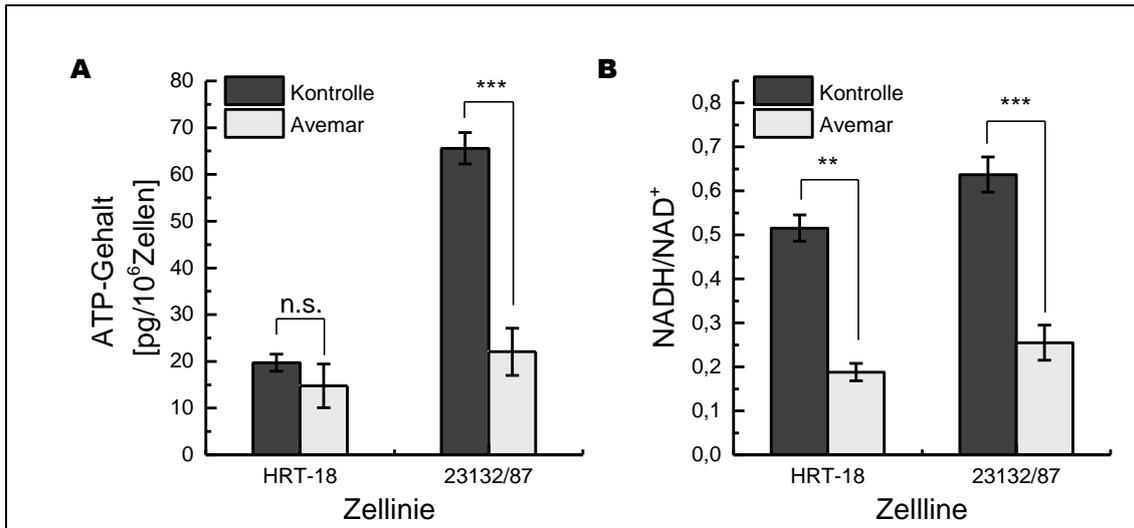


Abb. 4.13: Einfluss von Avemar auf den zellulären ATP Gehalt (A) und das NADH/NAD⁺ Verhältnis (B). Die Zellen wurden hierzu für 24 Stunden mit Avemar (10 mg/mL) inkubiert. Kontrolle erfolgte durch Inkubation der Zellen mit Medium ohne Avemar. ATP-Gehalt und das Verhältnis von NADH/NAD⁺ wurden mit entsprechenden Assays von Biovision bestimmt (s. Material und Methoden). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) von 2-3 unabhängigen Versuchen angegeben. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001, n.s. (nicht signifikant) P >0.05.

Das Verhältnis von reduzierter zu oxidierter Form (NADH/NAD⁺) von NAD (Abb. 4.13 B) zeigt, dass sich unter dem Einfluss von Avemar sowohl für 23132/87 Zellen als auch für HRT-18 Zellen das Verhältnis zugunsten der oxidierten Form verschob. Für 23132/87 nahm das Verhältnis von 1:2 auf 1:5 und für HRT-18 von 2:3 auf 1:5 ab. Die verhältnismäßige Zunahme von NAD⁺ lässt auf eine verminderte Reduktion von NAD⁺ in der Glykolyse schließen, was auf einen durch Avemar gestörten Glukoseumsatz über die Glykolyse hindeutet.

Um weitere Hinweise auf Avemar-induzierte Effekte im Stoffwechsel von 23132/87 und HRT-18 Zellen zu erhalten, wurden Messungen zum Glukoseverbrauch und zur Laktatproduktion durchgeführt. Bei Avemar-behandelten HRT-18 Zellen lag der Glukoseverbrauch nach 24 Stunden bei 53 % der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4.14 A). Nach 48 Stunden und nach 72 Stunden bei 31 %. Die Laktatbildung betrug nach 48 bzw. 72 Stunden 73 % bzw. 94 % der Kontrolle (Abb. 4.14 B und Tabelle 4.4). Das bedeutet, dass Avemar bei HRT-18-Zellen den Verbrauch von Glukose hemmt, während die Laktatproduktion weniger stark

beeinträchtigt wird. Bei 23132/87 Zellen hemmte Avemar den Verbrauch von Glukose nahezu vollständig (Abb. 4.14 C und Tabelle 4.4). Gleichermäßen verringerte sich die Bildung von Laktat (Abb. 4.14 D und Tabelle 4.4). Die hemmende Wirkung von Avemar auf den Glukosestoffwechsel von 23132/87 Zellen ist eine mögliche Erklärung für den beobachteten zytostatischen Effekt von Avemar (Abb. 4.7).

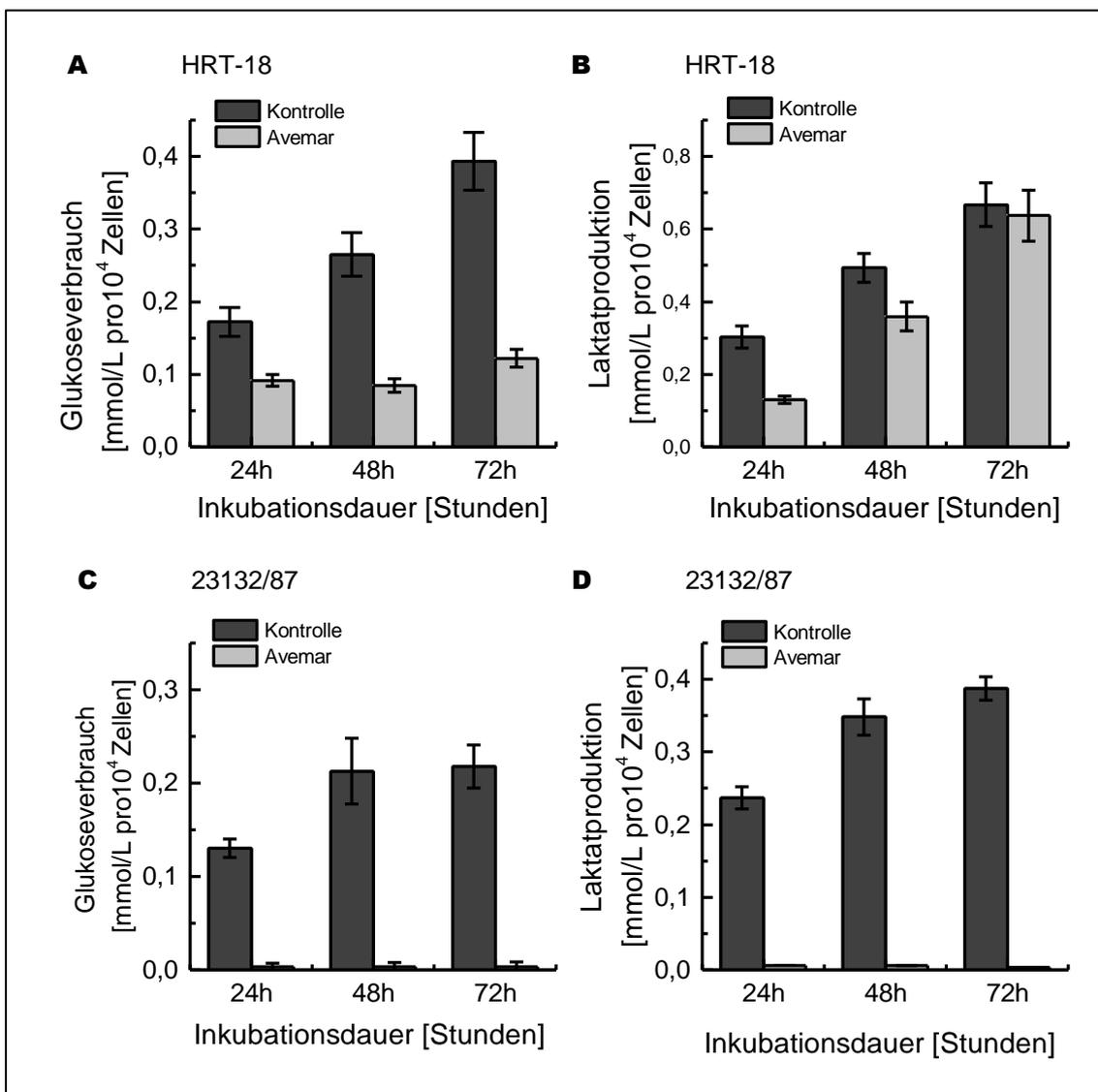


Abb. 4.14: Einfluss von Avemar auf Glukoseverbrauch und Laktatbildung. HRT-18 Zellen (A und B) und 23132/87 Zellen (C und D) wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit Avemar inkubiert. Kontrollzellen wurden in Medium ohne Avemar inkubiert. Die Zellzahl wurde mit dem KV-Assay bestimmt. Die Konzentration an Glukose bzw. Laktat wurde im Zellkulturüberstand zu den angegebenen Zeiten bestimmt. Die Werte wurden auf den Glukosegehalt bzw. Laktatgehalt vor Inkubation bezogen, um den Verbrauch an Glukose bzw. die Bildung von Laktat zu berechnen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) von 2-3 unabhängigen Versuchen angegeben.

Tabelle 4.4: Einfluss von Avemar auf Glukoseverbrauch (GV) und Laktatproduktion (LP). In Ergänzung zu Abb. 4.14 sind in der Tabelle die Mittelwerte für Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in mmol/L für 10⁴ Zellen angegeben. Zur besseren Übersicht sind zusätzlich Glukoseverbrauch und Laktatproduktion für die mit Avemar behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle) in Prozent angegeben. Glukose und Laktat wurden nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt (siehe Text Abb. 4.14).

	GV_{Kontrolle} [mmol/L]	GV_{Avemar} [% GV_{Kontrolle}]	LP_{Kontrolle} [mmol/L]	LP_{Avemar} [% LP_{Kontrolle}]
HRT 18 (24 Stunden)	0,17	0,09 [53 %]	0,30	0,12 [40 %]
HRT 18 (48 Stunden)	0,26	0,08 [31 %]	0,49	0,36 [73 %]
HRT 18 (72 Stunden)	0,39	0,12 [31 %]	0,67	0,63 [94 %]
23132/87 (24 Stunden)	0,13	0,003 [2 %]	0,23	0,006 [3 %]
23132/87 (48 Stunden)	0,21	0,003 [1 %]	0,35	0,006 [2 %]
23132/87 (72 Stunden)	0,22	0,003 [1 %]	0,39	0,003 [1 %]

Zusammenfassung (Kapitel 4.3.4):

Die durch Avemar induzierte Wachstumshemmung bei HRT-18 Zellen bzw. Zytostase bei 23132/87-Zellen geht mit einem verringerten Verbrauch an Glukose einher. Bei 23132/87-Zellen führt dies zum Zellzyklusarrest, zu einer Abnahme von ATP und einer Anreicherung von NAD⁺ (Abb. 4.13, Abb. 4.14). Avemar-behandelte HRT-18 Zellen weisen keine Veränderung im ATP-Gehalt auf (Abb. 4.13 A). Bei ihnen ist der Glukoseverbrauch stärker beeinträchtigt als die Laktatproduktion. Diese Beobachtung deutet auf eine von Glukose unabhängige Laktatbildung hin.

4.3.5 Avemar-induzierte Autophagie

Avemar-behandelte Zellen wurden lichtmikroskopisch auf Änderungen in der Zellmorphologie untersucht. Im Gegensatz zu 23132/87-Zellen (hier nicht gezeigt), wiesen Avemar behandelte HRT-18 Zellen deutliche morphologische Veränderungen auf. So waren bereits 24 Stunden nach Beginn der Inkubation mit Avemar intrazelluläre Vakuolen zu beobachten (Abb. 4.15 A), die über die Zeit an Größe zunahmten (Abb. 4.15 B und C).

Die Bildung intrazellulärer Vakuolen stellt ein charakteristisches Zeichen der Autophagie dar (Arstila AU und Trump BF, 1968). Durch den Verdau zelleigener

Organellen, können Zellen einen Mangel an energiereichen Substraten ausgleichen und ihr Überleben sichern (Mathew R et al., 2007).

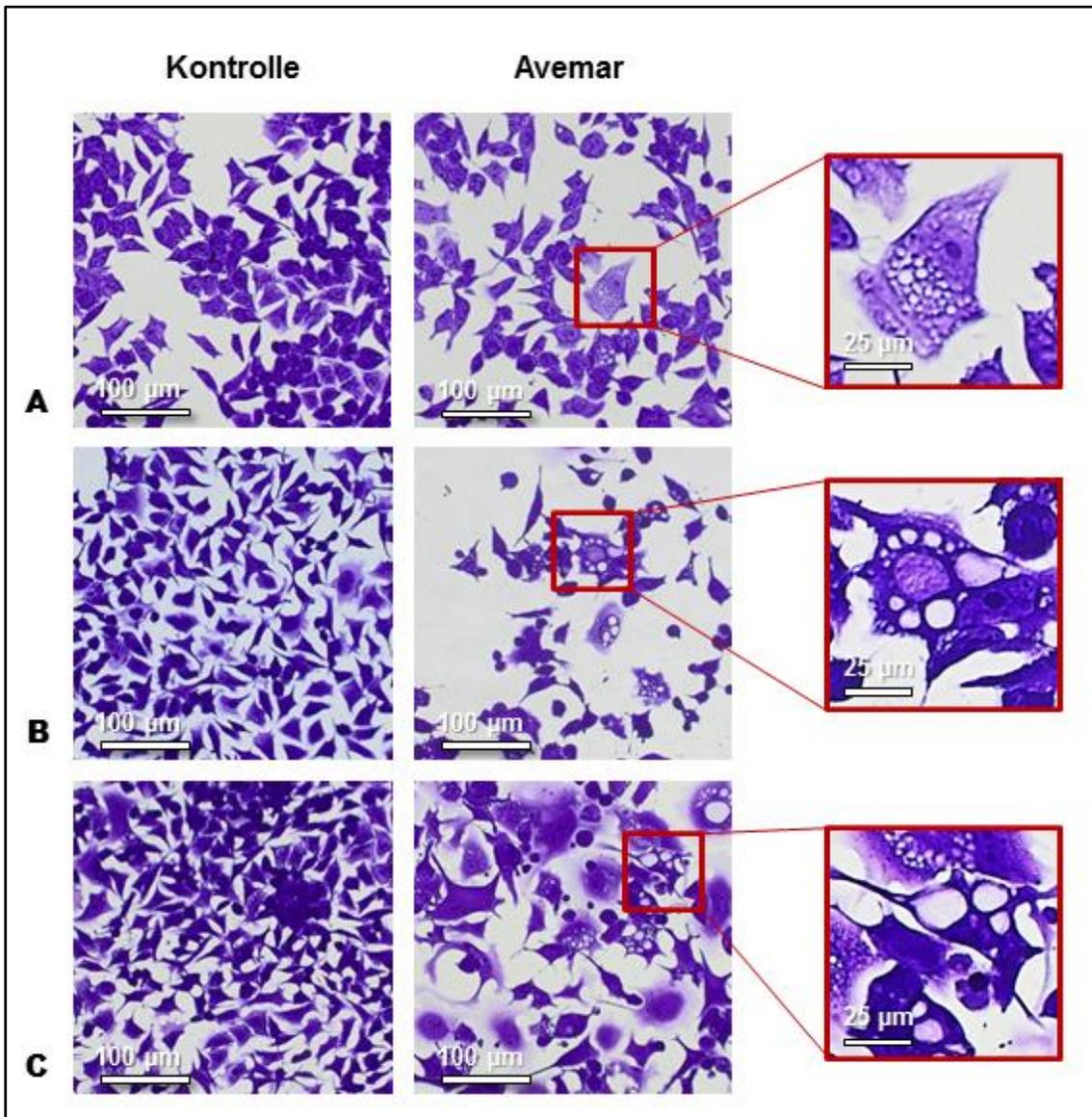


Abb. 4.15: Einfluss von Avemar auf die Morphologie von HRT-18 Zellen. Die Zellmorphologie ist 24 Stunden (A), 48 Stunden (B) und 72 Stunden (C) nach Beginn der Inkubation mit Avemar gezeigt. Die Zellen wurden für die lichtmikroskopischen Aufnahmen mit Methanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

Die bei HRT-18 Zellen durch Avemar induzierte Vakuolenbildung deutet auf Autophagie bzw. Apoptose hin. Der Nachweis, dass es sich hierbei um Autophagosomen handelte, wurde mit LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) erbracht, einem spezifischen Marker der Autophagosomenbildung. LC3-I (18kDa) ist die zytosolische Form von LC3, während LC3-II (16kDa) die in der

Autophagosommembran integrierte Form darstellt (Mizushima N und Yoshimori T, 2007).

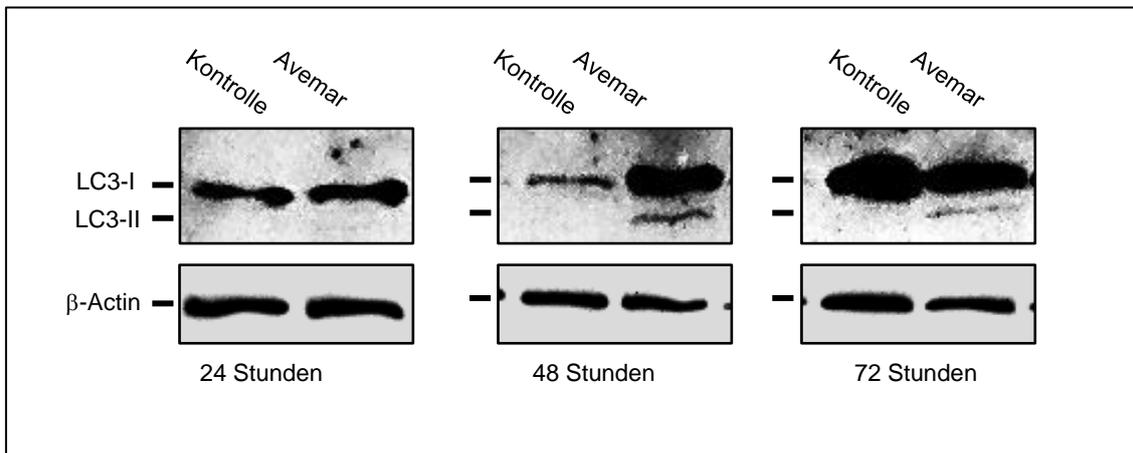


Abb. 4.16: Einfluss von Avemar auf die Expression von LC3-II in HRT-18 Zellen. Die Zellen wurden mit Medium (RPMI 1640, 10 % FCS) bzw. Avemar (10 mg/mL in Medium) inkubiert. Das Protein LC3 existiert in zwei Isoformen mit unterschiedlichem molekularem Gewicht: LC3-I (18 kDa) und LC3-II (16 kDa). Die Anwesenheit der LC3-II Isoform deutet auf autophagische Vorgänge in den Avemar behandelten HRT-18 Zellen hin (siehe auch Text).

Bei der Ausbildung von Autophagosomen kommt es zur Konversion der zytosolischen LC3-I zur Autophagosom-assoziierten LC3-II Isoform. In den ersten 24 Stunden nach Beginn der Inkubation mit Avemar war kein LC3-II nachzuweisen (Abb. 4.16). Dagegen trat nach 48 und 72 Stunden unter dem Einfluss von Avemar eine Konversion von LC3-I zu LC3-II auf. Mit längerer Dauer der Inkubation war die LC3-II Isoform auch weiterhin nachweisbar, ohne dass Ihr Anteil zunahm.

Zusammenfassung (Kapitel 4.3.5):

Avemar führt in HRT-18 Zellen zu zellmorphologischen Veränderungen, die bei Autophagie auftreten können. Der Nachweis des Autophagiemarkers LC3-II in Avemar-behandelten HRT-18 Zellen stützt die Annahme, dass Avemar autophagische Vorgänge in diesen Zellen auslöst.

4.4 Antiproliferative Effekte von Avemar an Fibroblasten

Der für maligne Zellen beschriebene antiproliferative Effekt von Avemar wurde zusätzlich an humanen Fibroblasten (NHDF-p) überprüft.

Fibroblasten wurden zunächst auf einen Zusammenhang zwischen dem antiproliferativen Effekt von Avemar und dem Zellwachstum untersucht. Dazu wurden wachstumsstimulierte und nicht stimulierte Fibroblasten miteinander verglichen. Hierfür wurden die Zellen in dem für Fibroblasten optimierten »Fibroblast Growth Medium 2« (FGM2) von PromoCell und RPMI 1640 kultiviert. Im Gegensatz zu RPMI 1640 enthält FGM2 die Wachstumsfaktoren Insulin und bFGF (»basic fibroblast growth factor«). Beide Nährmedien unterscheiden sich außerdem im FCS-Gehalt (10 % bei RPMI 1640; 2 % bei FGM2) und in der Glukosekonzentration (11 mmol/L bei RPMI 1640 und 8 mmol/L bei FGM2).

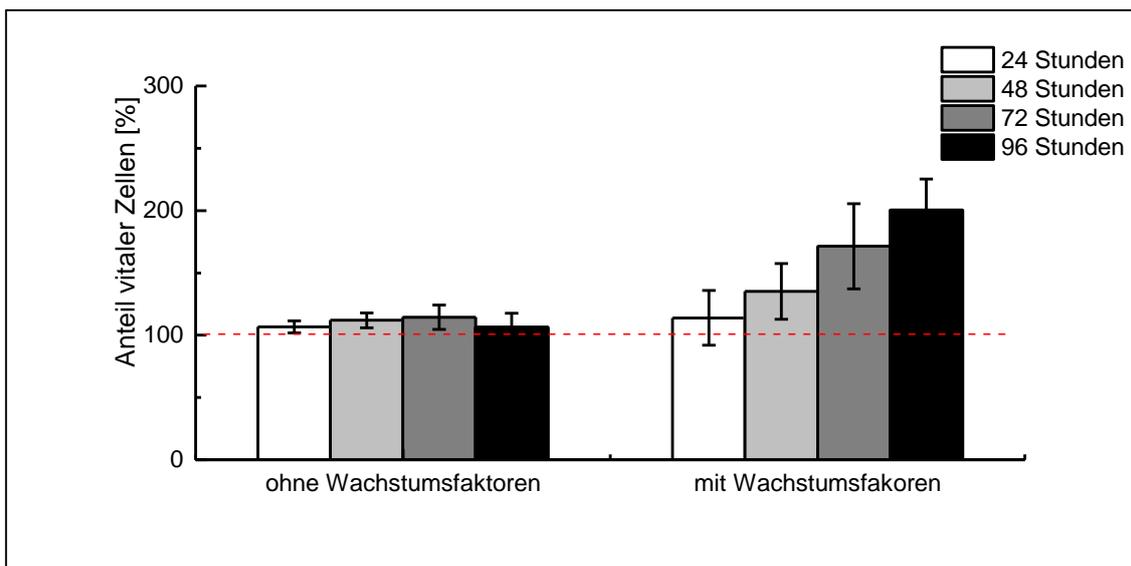


Abb. 4.17: Das Wachstum von Fibroblasten (NHDF-p) ohne und mit Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden für die gesamte Untersuchungsdauer in RPMI 1640 (ohne Wachstumsfaktoren) bzw. FGM2 (mit den Wachstumsfaktoren Insulin und bFGF) inkubiert. Die gestrichelte Linie entspricht der Ausgangszellzahl. Veränderungen in der Anzahl vitaler Zellen wurden prozentual zur Ausgangszellzahl berechnet. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (Fehlerbalken von 3-6 Messwerten (technische Replikate) angegeben. Basierend auf diesen Daten wurden die Verdopplungszeiten berechnet (Tabelle 4.5).

Die im FGM2-Medium enthaltenden Wachstumsfaktoren Insulin und bFGF führten zu einer deutlichen Steigerung der Zellproliferation (Abb. 4.17). Wachstumsstimulierte Fibroblasten wiesen eine Verdopplungszeit von 93 Stunden auf; die

von nicht stimulierten Fibroblasten war im Vergleich dazu 4-fach länger (Tabelle 4.5). Erwartungsgemäß war das Zellwachstum der Fibroblasten wesentlich langsamer als das Zellwachstum maligner Zellen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.5: Die Verdopplungszeit von Fibroblasten in Abhängigkeit der Wachstumsfaktoren Insulin und bFGF. Die Verdopplungs- bzw. Generationszeit (g) wurden aus den Mittelwerten der in Abb. 4.17 dargestellten Daten für die Kulturdauer von 72 Stunden nach folgender Formel berechnet: $g = \log 2 \times \Delta t / \log N - \log N_0$ mit Δt Kulturdauer in Stunden; N_0 Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt Null und N Anzahl der Zellen zum Ablesezeitpunkt. (-) ohne und (+) mit Wachstumsfaktoren. Die Ermittlung der Verdopplungszeiten dient zur Einschätzung der Wachstumsgeschwindigkeit. Der Wert für nicht stimulierte Fibroblasten ist aufgrund der fehlenden Proliferation als theoretisch zu betrachten.

	NHDF-p (-)	NHDF-p (+)
Verdopplungszeit^{*)}	380,9 ± 56,8	93,0 ± 8,0

^{*)} in Stunden.

Um die Wirkung von Avemar (10 mg/mL) in Abhängigkeit von der Proliferationsrate zu untersuchen, wurden stimulierte und nicht stimulierte Fibroblasten mit Avemar inkubiert (Abb. 4.18). Zunächst wurde der antiproliferative Effekt von Avemar für eine Inkubationsdauer von 24 Stunden untersucht. Während bei nicht-stimulierten Fibroblasten kein antiproliferativer Effekt von Avemar zu beobachten war, nahm bei stimulierten Fibroblasten der Anteil vitaler Zellen um 33 % ab (Abb. 4.18). Damit induzierte Avemar bei stimulierten Fibroblasten eindeutig zytotoxische Effekte. Ein Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate und der Empfindlichkeit von Fibroblasten gegenüber Avemar ließ sich somit zeigen. Bei malignen Zellen wurde dieser Zusammenhang nicht beobachtet (Kapitel 4.2).

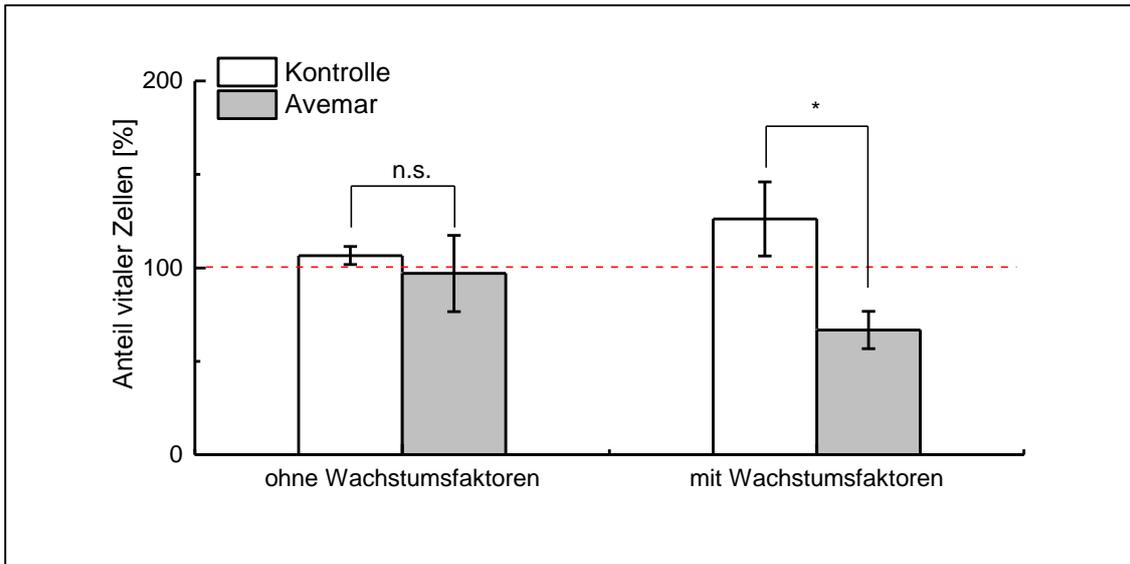


Abb. 4.18: Der antiproliferative Effekt von Avemar an Fibroblasten (NHDF-p) bei An- bzw. Abwesenheit der Wachstumsfaktoren bFGF und Insulin. Die Zellen wurden für 24 Stunden in RPMI (ohne Wachstumsfaktoren) bzw. FGM2 (mit Wachstumsfaktoren) inkubiert. Die gestrichelte Linie entspricht der Ausgangszellzahl. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) von 4-6 Messwerten angegeben. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, n.s. (nicht signifikant) P > 0.05.

Anschließend wurde der antiproliferative Effekt von Avemar an nicht wachstumsstimulierten Fibroblasten bei verlängerten Inkubationszeiten untersucht (Abb. 4.19).

Während für eine Inkubationszeit von 24 Stunden kein antiproliferativer Effekt von Avemar auf Fibroblasten zu beobachten war (Abb. 4.18), führte eine längere Inkubation zu einer deutlichen Abnahme vitaler Zellen um bis zu 30 % nach 48 Stunden und um bis zu 67 % nach 72 bzw. 96 Stunden, d.h. der antiproliferative Effekt von Avemar induzierte Zytotoxizität (Abb. 4.19). Dagegen stieg bei den unbehandelten Kontrollzellen der Anteil vitaler Zellen um 14 % nach 72 Stunden.

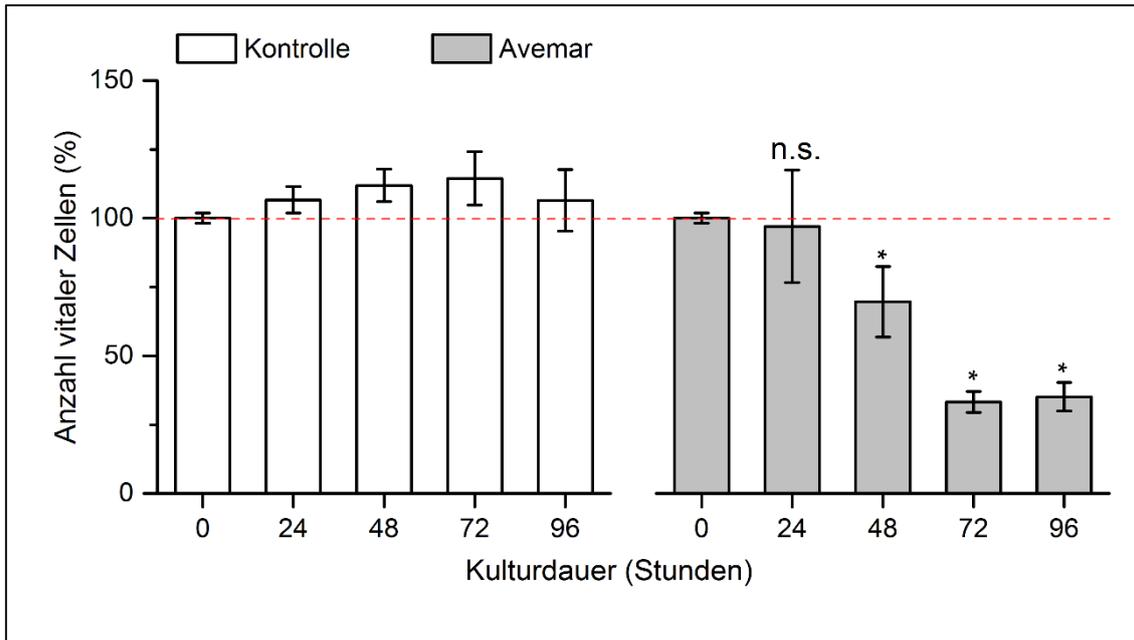


Abb. 4.19: Der antiproliferative Effekt von Avemar an nicht stimulierten Fibroblasten (NHDF-p) bei An- und Abwesenheit von Avemar. Dargestellt ist der Anteil vitaler Zellen der unbehandelten (Kontrolle) und der mit Avemar behandelten Fibroblasten. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeitintervalle dauerhaft mit Avemar inkubiert. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem KV-Assay bestimmt. Die gestrichelte Linie entspricht der Ausgangszellzahl. Veränderungen in der Anzahl vitaler Zellen wurden relativ zur Ausgangszellzahl berechnet. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung (Fehlerbalken) von 4-6 Messwerten (technische Replikate) angegeben. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001, n.s. (nicht signifikant) P >0.05.

Zusammenfassung (Kapitel 4.4):

Der antiproliferative Effekt von Avemar an humanen Fibroblasten weist eine Abhängigkeit von der Wachstumsrate auf. Im Gegensatz zu nicht stimulierten Fibroblasten löst Avemar bei wachstumsstimulierten Fibroblasten zytotoxische Effekte bereits nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden aus. In nicht stimulierten Fibroblasten induziert Avemar zytotoxische Effekte, wenn diese länger als 24 Stunden mit Avemar inkubiert werden.

Tabelle 4.6 fasst die Ergebnisse zum antiproliferativen Effekt von Avemar bei gastrointestinalen Tumorzellen und Fibroblasten zusammen.

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Ergebnisse zum antiproliferativen Effekt von Avemar.

	Zelllinie			
	BxPc-3	HRT-18	23132/87	NHDF-p
(a) Einfluss auf die Anzahl vitaler Zellen*				
Nach kurzer Inkubation (<24 h)	Zytotoxisch	Verzögernd	Zytostatisch	Ohne Wirkung
Nach langer Inkubation (>24 h)	Zytotoxisch	Zytotoxisch	Zytotoxisch	Zytotoxisch
(b) Oxidativer Stress **				
Bildung von ROS	40-fach	3-fach	6-fach	--
(c) Stoffwechsel **				
Einfluss auf ATP-Gehalt	--	ohne Wirkung	Verringerung um 70%	--
Einfluss auf Zellzyklus	--	ohne Wirkung	Arrest	--
Verbrauch von Glukose	--	Verringerung um 69 %	Verringerung um 99%	--
Bildung von Laktat	--	Verringerung um 27 %	Verringerung um 98 %	--
Autophagie	--	Ja	Nein	--

* s. auch Tabelle 4.3; **zytostatisch**: Änderung der Zellzahl von weniger als 15 % von der Ausgangszellzahl; **zytotoxisch**: Abnahme der vitalen Zellen um mehr als 15 % von der Ausgangszellzahl; **wachstumsverzögernd**: Zunahme der Zellzahl um mehr als 15 %, aber unterhalb der Wachstumskontrolle; **ohne Wirkung**: kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle; ** im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 24 Stunden (ATP-Gehalt, Zellzyklus, ROS) bzw. 48 Stunden (Autophagie, Laktatbildung, Glukoseverbrauch); (--) nicht untersucht.

5 Beantwortung der Fragen

Das antikanzerogene Potential von Avemar, einem onkologischen Supportivprodukt aus fermentierten Weizenkeimlingen, wurde an ausgewählten gastrointestinalen Zellen und an Fibroblasten *in vitro* untersucht. Im Fokus der Arbeit standen Untersuchungen zum antiproliferativen und antimetabolischen Effekt von Avemar.

1) Welche antiproliferativen Effekte weist Avemar an den drei humanen gastrointestinalen Tumorzelllinien und humanen Fibroblasten auf?

Folgende antiproliferativen Effekte waren für Avemar (10 mg/mL) nach 24 Stunden nachzuweisen: Zytotoxisch für Zellen der Zelllinie BxPc-3, zytostatisch für Zellen der Zelllinie 23132/87 und wachstumsverzögernd für Zellen der Zelllinie HRT-18. Der zytostatische und wachstumsverzögernde Effekt von Avemar war reversibel: Sobald die Zellen mit Avemar-freiem Medium inkubiert wurden, setzte die Zellproliferation wieder ein (Abb. 4.8). Wurden die Zellen dagegen länger als 24 Stunden mit Avemar inkubiert, so waren zytotoxische Effekte auch in 23132/87 und HRT-18 Zellen nachweisbar (Abb. 4.8). Ein antiproliferativer Effekt von Avemar an humanen Fibroblasten war für die ersten 24 Stunden der Inkubation nicht nachweisbar (Abb. 4.18). Im Gegensatz dazu führten längere Inkubationszeiten zu einer Abnahme vitaler Zellen um 30 % nach 48 Stunden und um 67 % nach 72 bzw. 96 Stunden (Abb. 4.19).

2) Wird die antikanzerogene Wirkung von Avemar durch DMBQ-induzierten oxidativen Stress ausgelöst?

Der zytotoxische Effekt von Avemar und DMBQ, der besonders deutlich an BxPc-3 Zellen nachgewiesen wurde, korrelierte mit einem erhöhten intrazellulären Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (Abb. 4.9 und Abb. 4.10). Somit ist anzunehmen, dass der zytotoxische Effekt von Avemar auf DMBQ-induziertem oxidativem Stress beruht. Der zytostatische bzw. wachstumsverzögernde Effekt von Avemar, der an 23132/87 Zellen und HRT-18 Zellen beobachtet wurde, ist auf

eine Beeinflussung des zellulären Glukosestoffwechsels zurückzuführen (Abb. 4.14); siehe hierzu die Antwort auf Frage 3.

3) Welche zellspezifischen Eigenschaften begünstigen den antiproliferativen Effekt von Avemar?

Bei Zellen der Pankreaskarzinomlinie BxPc-3, für die Avemar bereits nach einer Inkubation von 12 Stunden zytotoxisch war (Abb. 4.7), wurde das Enzym DT-Diaphorase nicht nachgewiesen (Abb. 4.4). Da die DT-Diaphorase vor DMBQ-induzierten oxidativen Stress schützt (Abb. 1.8), könnte das Fehlen dieses Enzyms den starken zytotoxischen Effekt von Avemar und DMBQ erklären.

Der zytostatische bzw. wachstumsverzögernde Effekt, der bei Zellen der Zelllinien HRT-18 und 23132/87 beobachtet wurde, beruht dagegen vermutlich auf einer Hemmung der Glykolyse. Beide Zelllinien wiesen einen hohen Glukoseumsatz mit partieller Glukoseoxidation auf, was durch eine entsprechend starke Laktatbildung (verursacht durch den Warburg-Effekt) bestätigt wurde (Tabelle 4.2). Der durch Avemar induzierte verringerte Verbrauch an Glukose löste bei 23132/87-Zellen eine Zellzyklusarretierung aus mit einem verringerten ATP-Gehalt und einer Zunahme an (oxidiertem) NAD^+ (Abb. 4.13, Abb. 4.14). Im Gegensatz dazu wiesen Avemar-behandelte HRT-18 Zellen keine Veränderung im ATP-Gehalt auf (Abb. 4.13 A). Eine bisher nicht beschriebene Besonderheit von Avemar wurde an Zellen der Zelllinie HRT-18 nachgewiesen. Hier waren zellmorphologische Veränderungen zu beobachten, wie sie auch bei Autophagie auftreten können. Der Nachweis des Autophagiemarkers LC3-II in Avemar-behandelten HRT-18 Zellen stützt die Annahme, dass Avemar in diesen Zellen autophagische Vorgänge auslöst.

6 Diskussion

6.1 Stellenwert der Alternativ-/Komplementärmedizin in der Onkologie

Immer häufiger äußern onkologische Patienten den Wunsch, über die therapeutischen Möglichkeiten der Schulmedizin hinaus, gegen ihr Krebsleiden ankämpfen zu wollen. Dabei gewinnt besonders die Alternativ- bzw. Komplementärmedizin immer mehr an Bedeutung. So nutzen bis zu 80 % der Krebspatienten in Deutschland alternative Therapiemethoden (Hübner J und Kleeberg U, 2009).

Auch Präparate der Alternativ- bzw. Komplementärmedizin sollten die Kriterien der evidenzbasierten Medizin erfüllen, d. h. die Wirksamkeit muss mit akzeptierten Standards (sowohl für Untersuchungen *in vitro* als auch für klinische Studien) bestätigt sein und Wechselwirkungen und Nebenwirkungen müssen bekannt sein (Hübner J und Kleeberg U, 2009). An der Klinik für Onkologie und Hämatologie im Klinikum Nürnberg bietet die Arbeitsgruppe »Biologische Krebstherapie« seit einigen Jahren unabhängige und evidenzbasierte Informationen zu komplementärmedizinischen Behandlungsverfahren auch als »Cochrane Reviews« an (www.cochranelibrary.com).

Insbesondere die Phytotherapie als Bereich der Alternativmedizin wird seit Einführung der sogenannten rationalen Phytotherapie dem Anspruch einer evidenzbasierten Medizin gerecht. Im Gegensatz zur traditionellen Phytotherapie, die die Wirksamkeit eines Präparats aufgrund von Erfahrungsberichten bewertet, basiert die rationale Phytotherapie auf toxikologischen und klinischen Sicherheits- und Wirksamkeitsstudien (Fintelman V und Weiss R, 2006). Das pflanzliche Supportivprodukt Avemar wurde nach den Prinzipien der rationalen Phytotherapie auf Wirksamkeit, Nebenwirkungen und Wechselwirkungen mit Chemotherapeutika *in vitro* und *in vivo* untersucht (Hidvegi M et al., 1999; Heimbach JT et al., 2007). Die Ergebnisse klinischer Studien weisen auf eine antitumorale Wirkung von Avemar hin (Jakab F et al., 2003; Demidov LV et al., 2008). Die therapeutischen Erfolge von Avemar können aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass die Wirkmechanismen von Avemar nicht vollständig aufgeklärt sind.

6.2 Versuchsdesign und -durchführung

Die bislang durchgeführten Untersuchungen zum antikanzerogenen Potential von Avemar *in vitro* wurden bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen durchgeführt, wodurch ein direkter Vergleich der Daten aus den verschiedenen Publikationen erschwert ist. So unterscheiden sich z. B. die Untersuchungen von Szende et al., Fajka-Boja et al. und Thai et al. in den Inkubationszeiten für Avemar und den eingesetzten Zellzahlen. Die Inkubationszeiten für Avemar schwanken zwischen 24 und 72 Stunden und die Zellzahlen zwischen 3×10^3 und 100×10^3 pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Fajka-Boja R et al., 2002; Szende B et al., 2004; Tai CJ et al., 2013). Dabei stellen die beiden genannten Beispiele nur zwei von einer ganzen Reihe an Faktoren dar, die das Ergebnis solcher In-Vitro-Untersuchungen stark beeinflussen können. Als weitere Einflussfaktoren sind die Methode zur Bestimmung der Zellvitalität, die Proliferationsrate der Zellen und die Konfluenz der Kultur zum Zeitpunkt der Untersuchung zu nennen (Yu X et al., 2012).

Hinzu kommt, dass auch die Angaben zur Aufbereitung von Avemar sehr variieren und teilweise unzureichend sind. So lösten z. B. Müller et al. Avemar in Wasser, zentrifugierten die Lösung und verwendeten den klaren Überstand für ihre Versuche (Mueller T et al., 2011). Judson et al. lösten Avemar in einer Konzentration von 40 mg/mL in PBS und filtrierten die Lösung mit einem 0,2 μm Filter (Judson PL et al., 2012). Für ihre Untersuchungen verwendeten die Autoren das klare Filtrat. Für die vorliegende Arbeit wurde Avemar nach der Beschreibung von Karaaslan und Eich (Karaaslan F, 2012; Eich K, 2013) in einer Konzentration von 100 mg/mL in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS angesetzt. Das Avemar-Pulver löste sich dabei vollständig im Medium. Die Stammlösung mit 100 mg/mL Avemar wurde über einen 0,2 μm Filter steril filtriert und für jeden Versuch frisch angesetzt. Die Unterschiede hinsichtlich der Löslichkeit von Avemar-Pulver lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass das Produkt Avemar vermutlich nicht in allen Fällen identisch war. Ursache hierfür könnten die zur geschmacklichen Verbesserung zugegebenen Supplemente sein. Das für diese Arbeit und von Karaaslan und Eich verwendete Avemar stammte von der Firma Biopharma Ltd. (Budapest, Ungarn).

Die nicht unerheblichen Unterschiede bei der Versuchsdurchführung tragen ohne Frage dazu bei, dass der in den einzelnen Arbeiten bestimmte Wert für die halbmaximale inhibitorische Konzentration von Avemar – auch als IC_{50} bezeichnet – stark voneinander abweicht. Die Angaben zum IC_{50} -Wert reichen von 0,03 mg/mL (Mueller T et al., 2011) bis 10 mg/mL (Boros LG et al., 2001). Die von Karaslaan und Eich ermittelten IC_{50} Werte für die drei in dieser Arbeit untersuchten gastrointestinalen Zelllinien sind folgende: BxPc-3: 4,0 bzw. 4,9 mg/mL ($4,5 \pm 0,7$ mg/mL) (Mittelwert \pm Standardabweichung); 23132/87: 6,4 bzw. 9,3 mg/mL ($7,9 \pm 2,1$) und HRT-18: 10,2 bzw. 21,3 mg/mL ($15,8 \pm 7,8$ mg/mL) (Karaaslan F, 2012; Eich K, 2013). In dieser Arbeit wurde der IC_{50} für die drei Zelllinien nicht erneut bestimmt, doch lässt der Vergleich mit Abb. 4.6 erkennen, dass das unterschiedliche Ansprechen der drei Zelllinien auf 10 mg/mL Avemar gut mit dem jeweiligen IC_{50} aus den beiden Arbeiten übereinstimmt.

In zahlreichen Veröffentlichungen zu Avemar werden 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone (DMBQ) als potentiell wirkendes Molekül diskutiert, jedoch fehlen experimentelle Daten zur Bestätigung dieser Annahme (Boros LG et al., 2001; Comin-Anduix B et al., 2002; Szende B et al., 2004; Illmer C et al., 2005; Johanning GL und Wang-Johanning F, 2007; Mueller T et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Bedeutung von DMBQ für den antiproliferativen Effekt von Avemar untersucht. Hierzu wurde der Reinstoff DMBQ in einer Konzentration eingesetzt, die zu der Konzentration an Benzochinonen in Avemar äquimolar ist (Karaaslan F, 2012; Eich K, 2013). Dieses Vorgehen ist bisher so nicht in Publikationen zu Avemar beschrieben.

6.3 Der antiproliferative Effekt von DMBQ und Avemar: Zytotoxizität

Der antiproliferative Effekt von Benzochinonen basiert auf der Bildung von Semichinonradikalen (Abb. 1.8 und Abb. 6.1). Zusätzlich zu der in Abb. 1.8 dargestellten Möglichkeit, mit Hilfe geeigneter Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure in einer Ein-Elektronen-Reaktion die Bildung von Semichinonradikalen zu induzieren, sind auch zelleigene Enzyme wie P450-abhängige Flavoenzyme hierzu in der

Lage (Gutierrez PL, 2000). Die Plasmamembran der Zelle stellt dabei für Benzochinone keine Barriere dar (Hölzel F et al., 1967). Durch Übertragung eines freien Elektrons auf molekularen Sauerstoff (Abb. 1.8) entstehen reaktive Sauerstoffspezies (Abb. 6.1) (Gutierrez PL, 2000).

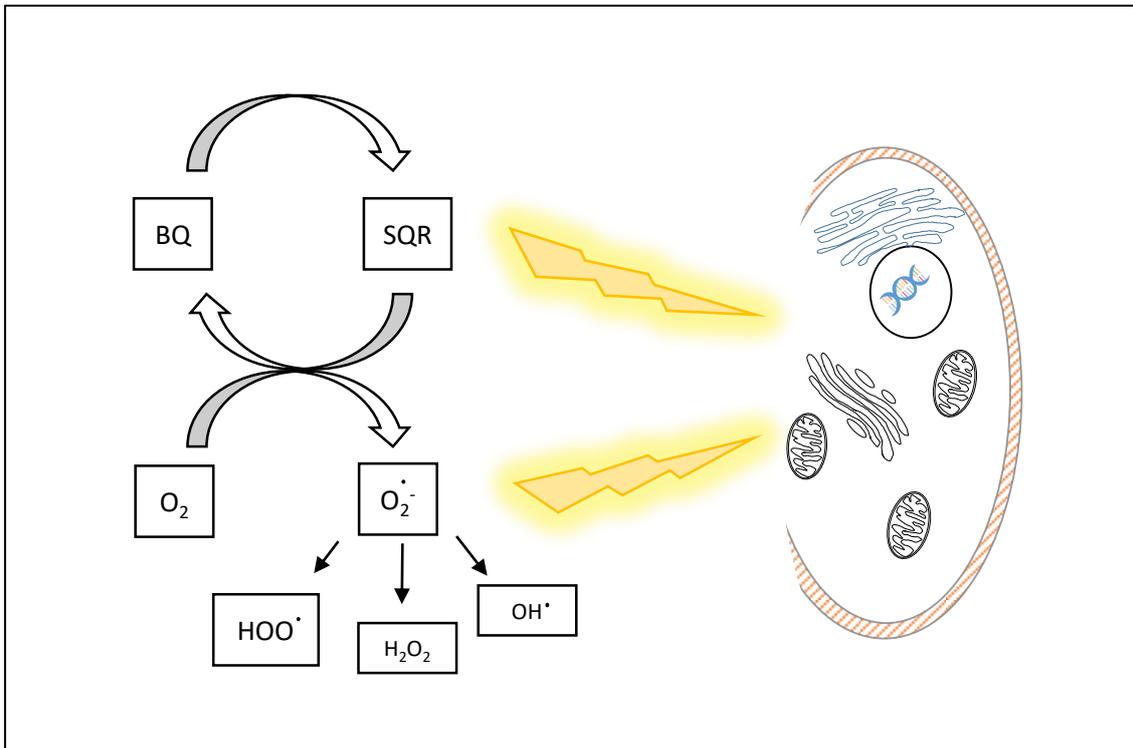


Abb. 6.1: Durch Benzochinone vermittelte Zytotoxizität. Durch Übertragung eines Elektrons auf Benzochinone (BQ) entsteht das zytotoxische Semichinonradikal (SQR). Semichinonradikale wirken zum einen direkt zytotoxisch, indem sie mit zahlreichen Biomolekülen in der Zelle reagieren (z. B. mit der DNA, die durch Fragmentierung zerstört wird). Zum anderen wirken Semichinonradikale indirekt zytotoxisch durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie O₂^{•-}, HOO[•], OH[•], H₂O₂ (Ottaviano FG et al., 2008). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird durch die Übertragung eines Elektrons vom Semichinonradikal (SQR) auf Sauerstoff (O₂) ausgelöst. Hierdurch entsteht aus dem Semichinonradikal wieder das Benzochinon (s. auch Abb. 1.8).

Avemar in einer Konzentration von 10 mg/mL und der Reinstoff DMBQ in einer äquimolaren Konzentration von 24 µmol/L (Kapitel 3.3.2) induzierten innerhalb von 12 Stunden einen zytotoxischen Effekt in Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie BxPc-3 (Abb. 4.7, Abb. 4.9). In diesen Zellen wurde ein bis zu 20-fach (DMBQ) bzw. bis zu 40-fach (Avemar) erhöhter Anteil an reaktiven Sauerstoffspezies im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen (Abb. 4.10).

Um die Ursache der starken zytotoxischen Wirkung von Avemar und DMBQ für BxPc-3 Zellen zu klären, wurden die Zellen auf die Expression der DT-Diaphorase untersucht (Abb. 4.4). Dieses Enzym schützt die Zelle vor dem Benzochinon-induzierten oxidativen Stress, indem es die zur Bildung von Semichinonradikalen führende Ein-Elektronen-Reaktion durch Katalyse einer Zwei-Elektronen-Reaktion verhindert (Abb. 1.8). Mit dieser Reaktion wird Benzochinon zum Benzo- hydrochinon reduziert (Gutierrez PL, 2000). Zur Katalyse dieser Reaktion sind reduzierte Reduktionsäquivalente in Form von NADPH als Kofaktor notwendig (Lind C et al., 1982). Mit der Quantifizierung der Reduktionsäquivalente in BxPc-3 Zellen und den anderen untersuchten Zelllinien wurde das Verhältnis von reduzierter (NADPH) zu oxidiertem (NADP⁺) Form bestimmt (Abb. 4.5 B). Dabei ergab sich für alle Zelllinien ein Verhältnis von NADPH zu NADP⁺ von größer 1, was besagt, dass die reduzierte Form von NADP im Überschuss vorlag. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Ursache für die starke Zelltoxizität von Avemar und DMBQ in BxPc-3 Zellen auf einen Mangel an reduzierten Reduktionsäquivalenten in diesen Zellen zurückzuführen ist.

Untersuchungen zur Expression der DT-Diaphorase im Westernblot ergaben, dass BxPc-3 Zellen im Gegensatz zu den beiden anderen Zelllinien das Enzym DT-Diaphorase nicht exprimierten (Abb. 4.4). Das Fehlen der DT-Diaphorase stellt eine Schwächung des antioxidativen Schutzsystems der Zelle dar (Kapitel 1.3), wodurch diese anfälliger für oxidativen Stress wird. Der Nachweis, dass DMBQ bzw. Avemar die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in BxPc-3 Zellen induzieren, deutet darauf hin, dass die bereits nach kurzer Inkubation nachzuweisende zytotoxische Wirkung beider Substanzen durch oxidativen Stress ausgelöst wird (Abb. 4.9, Abb. 4.10). So wurde im Vergleich zur Kontrolle ein 20-facher (DMBQ) bzw. 40-facher (Avemar) Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies in diesen Zellen gemessen (Abb. 4.10).

Auffällig beim Vergleich von Avemar- und DMBQ-induziertem oxidativem Stress ist, dass der Anteil an reaktiven Sauerstoffspezies bei Avemar doppelt so hoch war wie bei DMBQ. Diese Beobachtung könnte in Zusammenhang mit der kom-

plexen Zusammensetzung von Avemar stehen. Zusätzlich zu DMBQ enthält Avemar noch weitere Moleküle mit Chinonstruktur wie Methoxy-p-benzochinone (Cosgrove D et al., 1952), die ebenfalls stabile Semichinonradikale bilden können (O'brien P, 1991). Zwar sind MBQ zu ca. 0,02 % in Avemar enthalten (Hidvegi M et al., 2002), doch weisen diese bei Temperaturen über 20°C eine größere Instabilität auf als DMBQ (Hidvegi M et al., 2002). Da die Versuche in der Vorliegenden Arbeit bei 37°C durchgeführt wurden, wurde der antiproliferative Effekt von MBQ nicht weitergehend untersucht.

6.3.1 Zur Bedeutung von Ascorbinsäure für die Zelltoxizität von DMBQ und Avemar

Charakteristisch für BxPc-3 Zellen ist, dass DMBQ auch ohne das Reduktionsmittel Ascorbinsäure auf diese Zellen zytotoxisch wirken. Bei 23132/87 und HRT-18 Zellen wirken DMBQ ausschließlich zusammen mit Ascorbinsäure als Reduktionsmittel zytotoxisch (Abb. 4.9).

Avemar wirkt zusätzlich zum zytotoxischen Effekt bei BxPc-3 Zellen zytostatisch bei 23132/87 Zellen und wachstumshemmend bei HRT-18 Zellen (Abb. 4.7). Diese beiden Effekte von Avemar sind unabhängig davon, ob 23132/87 und HRT-18 Zellen zusätzlich mit Ascorbinsäure inkubiert wurden (Abb. 4.9 B und C). Dagegen war der zytotoxische Effekt von Avemar bei BxPc-3 Zellen ohne Ascorbinsäure wesentlich stärker als mit Ascorbinsäure (Abb. 4.9 A). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Ascorbinsäure mit weiteren biologisch aktiven Molekülen im Stoffgemisch Avemar reagiert, wodurch die Zytotoxizität von DMBQ verringert wird. Ein Beispiel für eine solche Substanz ist Vitamin E, das in Avemar zu 0,03-0,07 % enthalten ist (Brandolini A und Hidalgo A, 2012) und antioxidative Eigenschaften aufweist. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften kann Vitamin E durch Biomembranen diffundieren und in verschiedenen Zellkompartimenten reaktive Sauerstoffspezies neutralisieren (Packer JE et al., 1979). Ascorbinsäure regeneriert Vitamin E und induziert damit antioxidative Eigenschaften, die der prooxidativen und damit zytotoxischen Eigenschaft von Benzochinonen entgegenwirken (Abb. 6.2).

Eine Verringerung der Wirksamkeit von Avemar durch Zugabe von Ascorbinsäure wurde auch im Tierversuch festgestellt. Während Avemar in Mäusen die Metastasierung von Melanomzellen signifikant verringerte, war bei Tieren, die zusätzlich noch Ascorbinsäure erhielten, kein vergleichbarer hemmender Effekt auf die Metastasierung zu beobachten (Hidvegi M et al., 1998).

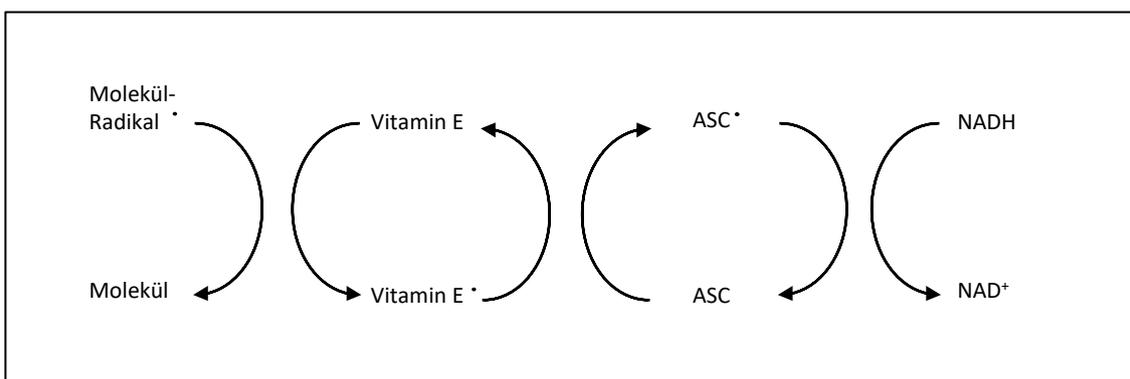


Abb. 6.2: Vitamin E als weiteres biologisch aktives Molekül in Avemar (zusätzlich zu DMBQ). Das Antioxidans Vitamin E wirkt möglicherweise dem zytotoxischen Effekt von Avemar durch Neutralisation von Radikalen entgegen. Durch Ascorbinsäure (ASC) wird Vitamin E regeneriert und ist dadurch in der Lage, weitere Radikale zu neutralisieren. Ascorbinsäure wiederum wird durch den Kofaktor NADH regeneriert. Schema in Anlehnung an Packer JE et al., 1979 mit einem Grafikprogramm selbst erstellt.

6.4 Der antiproliferative Effekt von Avemar: Zytostase und Wachstumshemmung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Avemar Zytostase in 23132/87 Zellen bzw. Wachstumshemmung in HRT-18 Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden induziert (Abb. 4.7). Wurde die Inkubationszeit von Avemar verlängert, so waren zytotoxische Effekte auch (wie bei BxPc-3 Zellen) bei 23132/87 Zellen zwischen 48 und 72 Stunden und bei HRT-18 Zellen zwischen 96 und 120 Stunden nachzuweisen (Abb. 4.8). Die Inkubation mit Avemar für 24 Stunden führte bei beiden Zelllinien kaum zu einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Abb. 4.10), weshalb oxidativer Stress als Ursache für den antiproliferativen Effekt bei HRT-18 und 23132/87 Zellen unwahrscheinlich erschien. Da bekannt ist, dass Avemar auch antimetabolische Eigenschaften aufweist (Illmer C et al., 2005), wurde bei diesen Zellen zusätzlich der Zellstoffwechsel untersucht.

23132/87 Zellen, die sich unter Avemareinfluss in einem Zellzyklusarrest (Abb. 4.12 B) befanden, wiesen zudem einen um 70 % verringerten ATP-Gehalt auf (Abb. 4.13 A). Da beide Messergebnisse als Indiz für einen Energiemangel gewertet werden können (Sweet S und Singh G, 1995), wurde zusätzlich der Glukosestoffwechsel beider Zelllinien untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich der Glukoseverbrauch bei HRT-18 Zellen während der Inkubation mit Avemar um bis zu 69 % und bei 23132/87 Zellen um bis zu 99 % nach 72 Stunden verringerte (Abb. 4.14 und Tabelle 4.4). Eine Beeinflussung des Glukosemetabolismus durch Avemar wurde auch von Boros et al. bei Pankreaskarzinomzellen beschrieben (Boros LG et al., 2001). Hier führte Avemar zu einer Verringerung des Glukoseverbrauchs um 50 % nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden. Comin-Anduix et al. zeigten an Zellen der Leukämiezelllinie Jurkat, dass Avemar die Aktivität der Hexokinase, einem Glukose-phosphorylierendem Enzym, das Glukose für den Abbau in der Glykolyse vorbereitet, verringert (Comin-Anduix B et al., 2002). Zudem wurde durch Avemar die Aktivität weiterer Enzyme des Glukosemetabolismus (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Transketolase, Laktatdehydrogenase) verringert (Comin-Anduix B et al., 2002).

Die durch Avemar induzierte Verringerung des zellulären Glukoseverbrauchs ist vermutlich auf eine Hemmung der Glykolyse zurückzuführen. Die in 23132/87 Zellen nachweisbaren Effekte durch die Inkubation mit Avemar waren Zytostase (Abb. 4.7), Zellzyklusarrest (Abb. 4.12) und ATP-Mangel (Abb. 4.13 A). Dagegen führte der durch Avemar ausgelöste verminderte Glukoseverbrauch in HRT-18 Zellen (Abb. 4.14 A) zu keiner Verringerung der ATP-Konzentration (Abb. 4.13 A); zudem blieb die Zellproliferation erhalten (Abb. 4.7). Dies lässt darauf schließen, dass HRT-18 Zellen in der Lage sind, bei einem gestörten Glukosestoffwechsel andere Energiequellen zur Kompensation zu nutzen. Vermutlich handelt es sich hierbei um Glutamin (Abb. 1.3). Diese Vermutung wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

6.4.1 Autophagie

Ein nachgewiesener Resistenzmechanismus von Tumorzellen gegenüber Nährstoffmangel und anderen Stressfaktoren stellt die Autophagie dar (Koehler BC et al., 2014). Durch den Verdau zelleigener Strukturen sichert die Zelle ihre Energieversorgung und ist dadurch zumindest zeitweise unabhängig von externen Energieträgern. Die Induktion von Autophagie ist abhängig von der Stärke der Stresssituation. Autophagische Vorgänge sind in aller Regel dann nachweisbar, wenn der einwirkende Stress nicht direkt letal für die Zelle ist. Bei starker Stresseinwirkung kommt es dagegen zur Aktivierung von Apoptose (Mariño G et al., 2014).

Avemar-behandelte HRT-18 Zellen wiesen nach 24 Stunden intrazelluläre Vakuolen auf (Abb. 4.15), die, sollte es sich um Autophagosomen handeln, ein charakteristisches Zeichen der Autophagie darstellen (Mizushima N, 2007). Der Nachweis des Autophagiemarkers LC3 in diesen Zellen stützte die Vermutung, dass Avemar in HRT-18 Zellen Autophagie induziert. Vom Protein LC3 existieren die beiden Isoformen LC3-I und LC3-II, die unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen und deshalb im Westernblot gut zu unterscheiden sind. In autophagischen Zellen kommt es zur Konversion des zytosolischen LC3-I zum Autophagosom-assoziierten LC3-II (Mizushima N und Yoshimori T, 2007). In Avemar-behandelten HRT-18 Zellen war nach 48 Stunden die Isoform LC3-II nachzuweisen (Abb. 4.16).

Die als Reaktion auf die Inkubation mit Avemar induzierte Autophagie in HRT-18 Zellen wies eine zytoprotektive Funktion für eine Inkubationszeit von länger als 96 Stunden auf. So betrug der Anteil vitaler HRT-18 Zellen nach 96 Stunden noch 89 %. Im Vergleich dazu lag der Anteil vitaler 23132/87 Zellen bei 6 % (Abb. 4.8). Das zytoprotektive Potential von Autophagie bei Nährstoffmangel ist jedoch begrenzt, da der Zelle nur eine limitierte Anzahl an Zellorganellen zur Energiegewinnung zur Verfügung steht, bevor sie sie durch die Aktivierung von Apoptose zugrunde geht (Caro-Maldonado A und Muñoz-Pinedo C, 2011). Dementsprechend lag der Anteil vitaler HRT-18 Zellen nach 120 Stunden nur noch bei 15 %.

Mit dieser Arbeit gelang es erstmals, Indizien dafür zu präsentieren, dass Avemar durch Induktion von Autophagie antiproliferative Wirkung aufweist. Dies wurde an HRT-18 Zellen gezeigt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Vorgänge bei der Avemar-induzierten Autophagie besser zu verstehen.

6.5 Der antiproliferative Effekt von Avemar an nicht-malignen Zellen

Der selektive antiproliferative Effekt von Avemar gegenüber Tumorzellen wurde sowohl in klinischen Studien als auch in Tierversuchen und *in vitro* untersucht. Die für Tumorzellen zytotoxische Konzentration an Avemar *in vitro* war ohne Wirkung bei nicht-entarteten Zellen (Comin-Anduix B et al., 2002; Fajka-Boja R et al., 2002). Comin-Anduix et al. überprüften den antiproliferativen Effekt von Avemar an humanen peripheren Blutlymphozyten und stellten dabei fest, dass humane Lymphozyten einen 50-fach höheren EC₅₀-Wert aufwiesen als die ebenfalls von ihnen untersuchten Zellen der T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat (Comin-Anduix B et al., 2002). Fajka-Boja et al. zeigten ebenfalls an Jurkatzellen, dass die Inkubation mit 1 mg/mL Avemar nach 24 Stunden zu einem Anstieg apoptotischer Zellen führte, den sie bei humanen peripheren Blutmonozyten nicht beobachteten (Fajka-Boja R et al., 2002). In Tierversuchen wurden toxische Nebenwirkungen bei der vom Hersteller empfohlenen täglichen Avemar-Dosis von 121 mg pro kg Körpergewicht ausgeschlossen (Heimbach JT et al., 2007). In klinischen Studien zu Avemar wurden bei den meisten Patienten keine oder nur milde Nebenwirkungen wie Übelkeit oder Meteorismus festgestellt (Jakab F et al., 2003; Demidov LV et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde der antiproliferative Effekt von 10 mg/mL Avemar an wachstumsstimulierten und nicht stimulierten Fibroblasten untersucht. Zur Stimulierung von Fibroblasten wurde das von PromoCell für die Kultivierung von Fibroblasten optimierte Kulturmedium (»*Fibroblast Growth Medium 2*«) verwendet. Dieses Medium enthält die Wachstumsfaktoren Insulin und den Fibroblastenwachstumsfaktor bFGF (»*basic fibroblast growth factor*«). Die Inkubation mit Avemar führte nach 24 Stunden bei stimulierten Fibroblasten zu zytotoxischen Effekten, wohingegen nicht stimulierte Fibroblasten in ihrer Zellvitalität

unbeeinflusst blieben (Abb. 4.18). Somit scheint die zytotoxische Wirkung von Avemar bei Fibroblasten von der Wachstumsgeschwindigkeit abhängig zu sein – im Gegensatz zur Wirkung von Avemar bei malignen Zellen (Kapitel 4.2). Die Langzeitinkubation mit Avemar führte auch bei nicht stimulierten Fibroblasten zu zytotoxischen Effekten (Abb. 4.19).

Humane Primärzellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen aus der Nabelschnur (*»human umbilical vein endothelial cells«*, abgekürzt HUVEC) werden sehr häufig als nicht-maligne Kontrollzellen verwendet. Ihre Gewinnung ist ethisch unproblematisch und sie lassen sich zeitlich begrenzt gut kultivieren (Spitzbart H und Schmidt F, 1970). Solche Zellen weisen im Vergleich zu malignen Zellen eine niedrigere Proliferationsrate auf (Tab. 4.1 und Tab. 4.5), weshalb die für diese Zellen optimierten Zellkulturmedien häufig verschiedene Wachstumsfaktoren enthalten wie z. B. Insulin und Fibroblastenwachstumsfaktor bFGF zur Kultivierung von Fibroblasten.

Der Fibroblastenwachstumsfaktor bFGF verstärkt neben der Zellproliferation auch die Expression des Glukosetransporters GLUT-1, der ebenfalls in malignen Zellen hochreguliert ist (Liu M et al., 2012). Die erhöhte Expression von GLUT-1 ermöglicht der Zelle eine vermehrte Aufnahme und Verstoffwechslung von Glukose. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an wachstumsstimulierten Fibroblasten weisen auf einen erhöhten Glukoseumsatz hin (Tab. 4.2), wobei die Zellen mehr als 1/3 der Glukose vollständig in ihren Mitochondrien oxidieren. Mit Wachstumsfaktoren stimulierte Fibroblasten zeigten nicht nur einen erhöhten Glukoseverbrauch, sondern auch eine verstärkte Zellproliferation. Diese beiden Eigenschaften sind auch für maligne Zellen charakteristisch. Inwieweit der antiproliferative Effekt von Avemar an stimulierten Fibroblasten im Gegensatz zu bisherigen klinischen Studien steht, die über keine bzw. allenfalls milde Nebenwirkungen berichten (Jakab F et al., 2003; Demidov LV et al., 2008), sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

7 Ausblick

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zum antikanzerogenen Potential von Avemar an gastrointestinalen Tumorzellen führten zur Identifizierung der drei Wirkqualitäten «zytotoxisch», «zytostatisch» und «wachstumsverzögernd». Zusätzlich war ein wesentliches Ziel der Arbeit, die Bedeutung von DMBQ als potentiell wirkmolekül von Avemar für die drei Wirkqualitäten zu prüfen.

Die Ergebnisse für die Pankreaskarzinomzelllinie BxPc-3 lassen den Schluss zu, dass der zytotoxische Effekt von Avemar durch die DMBQ-induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ausgelöst wird. Ein eingeschränkter antioxidativer Schutz der Zelle gegenüber oxidativen Stress verstärkt möglicherweise die zytotoxische Wirkung von DMBQ. Die vor Benzochinonradikalen schützende DT-Diaphorase fehlte ausschließlich in BxPc-3 Zellen. Es sollte an weiteren Pankreaskarzinomzelllinien geprüft werden, ob auch in diesen Zellen die Expression der DT-Diaphorase verändert ist und somit möglicherweise ein Charakteristikum dieser Krebsentität darstellt.

Die in der Literatur mehrfach beschriebene Beeinflussung der Glykolyse durch Avemar wurde in der vorliegenden Arbeit an Zellen der Magenkarzinomzelllinie 23132/78 und der Rektumkarzinomzelllinie HRT-18 bestätigt. Untersuchungen zum Stoffwechsel von Tumorzellen werden *in vitro* in aller Regel bei einer Sauerstoffkonzentration von 21 % durchgeführt, obgleich in Tumorgeweben Sauerstoffkonzentrationen von weniger als 2 % eher die Regel als die Ausnahme darstellen (Vaupel P und Mayer A, 2007). Aus diesem Grund sollten weitere Untersuchungen zur Wirkung von Avemar auch bei Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt werden, die für die Versorgung von Tumoren *in vivo* charakteristisch sind. Möglicherweise bewirkt die Hemmung der Glykolyse durch Avemar einen stärkeren zytotoxischen Effekt bei diesen Sauerstoffkonzentrationen.

8 Zusammenfassung

Unter dem Namen Avemar sind fermentierte Weizenkeimlinge als onkologisches Supportivprodukt erhältlich. Der hohe Anteil an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen (DMBQ) in Avemar soll für das *in vitro* und *in vivo* belegte antikanzerogene Potential verantwortlich sein. DMBQ wirken über Semichinonradikale bzw. durch Ausbildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Induktion von oxidativem Stress zytotoxisch. Da Tumorzellen empfindlicher auf oxidativen Stress reagieren als gesunde Zellen, kann dies die selektive zytotoxische Wirkung von Avemar erklären.

Die Beteiligung von DMBQ am antiproliferativen Effekt von Avemar und die Wirkung von Avemar auf den Stoffwechsel maligner Zellen sind derzeit nicht eindeutig geklärt. Die antiproliferativen Eigenschaften von Avemar und DMBQ als Reinstanz wurden miteinander verglichen. Hierzu wurden DMBQ in einer zu Avemar mit 0,04 % Benzochinonen äquimolaren Konzentration von 24 µmol/L eingesetzt.

Die Ergebnisse der Arbeit lassen den Schluss zu, dass der starke zytotoxische Effekt von Avemar bei BxPc-3 Zellen auf einen DMBQ-induzierten oxidativen Stress zurückzuführen ist. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde für BxPc-3 Zellen bei der Inkubation mit DMBQ eine 20-fache bzw. mit Avemar eine 40-fache Zunahme des ROS-Indikators 2',7'-Dichlorofluorescein gemessen. Im Westernblot ließ sich bei BxPc-3 Zellen das Enzym DT-Diaphorase, welches die Zellen vor Benzochinon-induziertem oxidativem Stress schützt, nicht nachweisen. In Zellen der anderen beiden Zelllinien konnte das Enzym nachgewiesen werden. Das mangelnde Schutzsystem gegenüber DMBQ-induziertem oxidativem Stress könnte demzufolge den DMBQ vermittelten zytotoxischen Effekt von Avemar in BxPc-3 Zellen erklären. Zusätzlich zum zytotoxischen Effekt wies Avemar zwei weitere antiproliferative Effekte auf: Zytostase bei 23132/87 Zellen und Wachstumsverzögerung bei HRT-18 Zellen. Beide antiproliferativen Effekte waren auf die Beeinflussung des Zellmetabolismus zurückzuführen. Avemar verringerte den zellulären Glukoseverbrauch von HRT-18 Zellen um 69 % und von

23132/87 Zellen um 99 %. In 23132/87 Zellen korrelierte der verringerte Glukoseverbrauch mit einer Abnahme von ATP um 70 % und einem Zellzyklusarrest in der G₂/M Phase. Der durch die Inkubation von HRT-18 Zellen mit Avemar ausgelöste verringerte Glukoseverbrauch beeinflusste hingegen weder den ATP-Gehalt noch den Zellzyklus, induzierte aber Autophagie. Dies ließ sich zeigen durch morphologische Veränderungen wie die Bildung von intrazellulären Vakuolen und durch den Nachweis des Autophagiemarkers LC3-II. Die Wertigkeit dieses Phänomens für die zytotoxischen Eigenschaften von Avemar ist in weiteren Untersuchungen zu klären.

Die antiproliferativen Eigenschaften von Avemar führen zu Veränderungen im Zellmetabolismus von gastrointestinalen Tumorzellen. Ausschlaggebend dafür, welcher der drei antiproliferativen Effekte von Avemar («zytotoxisch», «zytostatisch» oder «wachstumsverzögernd») dominiert, sind vermutlich zelleigene Schutzsysteme und metabolische Charakteristika der Zellen. Avemar weist ein breites Spektrum antiproliferativer Effekte auf, deren Einfluss auf Zellfunktion und Zellstoffwechsel im Detail noch weiter untersucht werden sollte.

9 Literaturverzeichnis

- Arstila AU und Trump BF. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am J Pathol* 1968, 53(5): 687.
- Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat Rev Drug Discov* 2008, 7(12): 1001-1012.
- Bachur NR, Gordon SL und Gee MV. A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Cancer Res* 1978, 38(6): 1745-1750.
- Bedard K und Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007, 87(1): 245-313.
- Bensingler SJ und Christofk HR. New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Semin Cell Dev Biol* 2012, 23(4): 352-361.
- Bertout JA, Patel SA und Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008, 8(12): 967-975.
- Boros LG, Lapis K, Szende B, Tomoskozi-Farkas R, Balogh A, Boren J, Marin S, Cascante M und Hidvegi M. Wheat germ extract decreases glucose uptake and RNA ribose formation but increases fatty acid synthesis in MIA pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas* 2001, 23(2): 141-147.
- Boros LG, Nichelatti M und Shoenfeld Y. Fermented wheat germ extract (Avemar) in the treatment of cancer and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2005, 1051: 529-542.
- Brandolini A und Hidalgo A. Wheat germ: not only a by-product. *Int J Food Sci Nutr* 2012, 63(S1): 71-74.
- Brunmark A, Cadenas E, Lind C, Segura-Aguilar J und Ernster L. DT-diaphorase-catalyzed two electron reduction of quinone epoxides. *Free Radic Biol Med* 1987, 3(3): 181-188.
- Caro-Maldonado A und Muñoz-Pinedo C. Dying for something to eat: how cells respond to starvation. *T Op Cell Sign J* 2011, 3: 42-51.
- Castro L und Freeman BA. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* 2001, 17(2): 161-165.
- Chiarugi A, Dolle C, Felici R und Ziegler M. The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* 2012, 12(11): 741-752.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM und Cantley LC. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 2008, 452(7184): 181-186.
- Comin-Anduix B, Boros LG, Marin S, Boren J, Callol-Massot C, Centelles JJ, Torres JL, Agell N, Bassilian S und Cascante M. Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. *J Biol Chem* 2002, 277(48): 46408-46414.

- Cosgrove D, Daniels D, Greer E, Hutchinson J, Moran T und Whitehead J. Isolation of Methoxy-and 2: 6-Dimethoxy-p-benzoquinone from Fermented Wheat Germ. *Nature* 1952, 169(4310): 966-967.
- Cutler DM. Are we finally winning the war on cancer? *J Econ Perspect* 2008, (4): 3-26.
- Degterev A und Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9(5): 378-390.
- Demidov LV, Manziuk LV, Kharkevitch GY, Pirogova NA und Artamonova EV. Adjuvant fermented wheat germ extract (Avemar™) nutraceutical improves survival of high-risk skin melanoma patients: a randomized, pilot, phase II clinical study with a 7-year follow-up. *Cancer Biother Radiopharm* 2008, 23(4): 477-482.
- Edinger AL und Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2004, 16(6): 663-669.
- Eich K. Untersuchungen in vitro zur therapeutischen Wertigkeit von 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen im Supportivprodukt Avemar 2013, Doktorarbeit, Universität Würzburg.
- Fajka-Boja R, Hidvegi M, Shoenfeld Y, Ion G, Demydenko D, Tomoskozi-Farkas R, Vizler C, Telekes A, Resetar A und Monostori E. Fermented wheat germ extract induces apoptosis and downregulation of major histocompatibility complex class I proteins in tumor T and B cell lines. *Int J Oncol* 2002, 20(3): 563-570.
- Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, Teruya-Feldstein J, Moreira PI, Cardoso SM, Clish CB, Pandolfi PP und Haigis MC. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer Cell* 2011, 19(3): 416-428.
- Fintelmann V und Weiss R. Lehrbuch der Phytotherapie. 11. Aufl. Stuttgart: Hippokrates 2006.
- Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G und Hoves S. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007, 109(9): 3812-3819.
- Garber K. Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96(24): 1805-1806.
- Gatenby RA und Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004, 4(11): 891-899.
- Gillies RJ, Didier N und Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 1986, 159(1): 109-113.
- Gillies RJ und Gatenby RA. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2007, 26(2): 311-317.
- Gupte A und Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2009, 35(1): 32-46.

- Gutierrez PL. The metabolism of quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement. *Front Biosci* 2000, 5: 629-638.
- Halestrap A und Price N. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 1999, 343: 281-299.
- Heberger S. Zur Krebssterblichkeit in Deutschland–wie kommen Mortalitätsstatistiken in Deutschland zustande? *Z Allgemeinmed* 2014, 90 (7): 323-326.
- Heimbach JT, Sebestyen G, Semjen G und Kennepohl E. Safety studies regarding a standardized extract of fermented wheat germ. *Int J Toxicol* 2007, 26(3): 253-259.
- Hensley CT, Wasti AT und DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest* 2013, 123(9): 3678.
- Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi-Farkas R, Paku S, Lapis K und Szende B. Effect of Avemar and Avemar + vitamin C on tumor growth and metastasis in experimental animals. *Anticancer Res* 1998, 18(4A): 2353-2358.
- Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi-Farkas R, Szende B, Paku S, Pronai L, Bocsi J und Lapis K. MSC, a new benzoquinone-containing natural product with antimetastatic effect. *Cancer Biother Radiopharm* 1999, 14(4): 277-289.
- Hidvegi M, Tomoskozine RF, Lapis K, Raso E und Szende B. Immunostimulatory and metastasis inhibiting fermented vegetal material. 2002, US 2012/0164132 A1.
- Höckel M und Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93(4): 266-276.
- Hölzel F, Hebbeln H, Höcke E und Maass H. Die Penetration und die intracelluläre Verteilung von Trenimon, p-Benzochinon, Actinomycin und Tri-äthylenmelamin (TEM) bei in vitro-Untersuchungen mit Ehrlich-Ascitestumorzellen. *Z Krebsforsch* 1967, 70(1): 74-94.
- Hübner J und Kleeberg U. Komplementäre Onkologie–ist ein evidenzbasierter Ansatz möglich und sinnvoll? *Der Onkologe* 2009, 15(2): 173-176.
- Illmer C, Madlener S, Horvath Z, Saiko P, Losert A, Herbacek I, Grusch M, Krupitza G, Fritzer-Szekeres M und Szekeres T. Immunologic and biochemical effects of the fermented wheat germ extract Avemar. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005, 230(2): 144-149.
- Issaeva N, Bozko P, Enge M, Protopopova M, Verhoef LG, Masucci M, Pramanik A und Selivanova G. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53–HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med* 2004, 10(12): 1321-1328.
- Jakab F, Mayer A, Hoffmann A und Hidvegi M. First clinical data of a natural immunomodulator in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 1999, 47(32): 393-395.
- Jakab F, Shoenfeld Y, Balogh A, Nichelatti M, Hoffmann A, Kahán Z, Lapis K, Mayer A, Sapy P und Szentpetery F. A medical nutriment has supportive value in the treatment of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2003, 89(3): 465-469.

- Johanning GL und Wang-Johanning F. Efficacy of a medical nutriment in the treatment of cancer. *Altern Ther Health Med* 2007, 13(2): 56-63; quiz 64-65.
- Judson PL, Al Sawah E, Marchion DC, Xiong Y, Bicaku E, Bou Zgheib N, Chon HS, Stickles XB, Hakam A, Wenham RM, Apte SM, Gonzalez-Bosquet J, Chen DT und Lancaster JM. Characterizing the efficacy of fermented wheat germ extract against ovarian cancer and defining the genomic basis of its activity. *Int J Gynecol Cancer* 2012, 22(6): 960-967.
- Kalberer JT. Impact of the National Cancer Act on grant support. *Cancer Res* 1975, 35(3): 472-481.
- Kämmerer U, Gires O, Pfetzer N, Wiegering A, Klement RJ und Otto C. TKTL1 expression in human malign and benign cell lines. *BMC Cancer* 2015, 15(1): 2.
- Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M und Druker B. Hematologic and Cytogenetic Responses to Imatinib Mesylate in Chronic Myelogenous Leukemia. *N Engl J Med* 2002, 346(9): 645-652.
- Karaaslan F. Untersuchungen zum antikanzerogenen Potential von Benzochinonen: Oxidativer Stress als Auslöser zelltoxischer Effekte 2012, Doktorarbeit, Universität Würzburg.
- Kim JW, Gao P und Dang CV. Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev* 2007, 26(2): 291-298.
- Koehler BC, Jager D und Schulze-Bergkamen H. Targeting cell death signaling in colorectal cancer: current strategies and future perspectives. *World J Gastroenterol* 2014, 20(8): 1923-1934.
- Krebs H. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem* 1971, 8: 1-34.
- Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 1975, 66(1): 188-193.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G und Nomenclature Committee on Cell D. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009, 16(1): 3-11.
- Lin SJ und Guarente L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2003, 15(2): 241-246.
- Lind C, Hochstein P und Ernster L. DT-diaphorase as a quinone reductase: A cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch Biochem Biophys* 1982, 216(1): 178-185.
- Liu M, Wang W, Hou Y, Yu Y, Ren G, Kern T, Sun G und Li D. Fibroblast growth factor (FGF)-21 regulates glucose uptake through GLUT1 translocation. *Afr J Microbiol Res* 2012, 6(10): 2504-2511.

- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A und Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8(9): 741-752.
- Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C und Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2012. *Ann Oncol* 2012, 23(4): 1044-1052.
- Marie SK und Shinjo SM. Metabolism and brain cancer. *Clinics* 2011, 66 (1): 33-43.
- Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH und Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, 15(2): 81-94.
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V und White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007, 7(12): 961-967.
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961, 191(4784): 144-148.
- Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007, 21(22): 2861-2873.
- Mizushima N und Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007, 3(6): 542.
- Mueller T, Jordan K und Voigt W. Promising cytotoxic activity profile of fermented wheat germ extract (Avemar(R)) in human cancer cell lines. *J Exp Clin Cancer Res* 2011, 30: 42.
- O'brien P. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 1991, 80(1): 1-41.
- Onyango P, Celic I, McCaffery JM, Boeke JD und Feinberg AP. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(21): 13653-13658.
- Ottaviano FG, Handy DE und Loscalzo J. Redox regulation in the extracellular environment. *Circ J* 2008, 72(1): 1-16.
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B und Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012, 45(6): 487-498.
- Packer JE, Slater T und Willson R. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979, 278(5706): 737-738.
- Papac RJ. Origins of cancer therapy. *Yale J Biol Med* 2001, 74(6): 391-398.
- Pasteur L. Experiences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. *Comp Rend Acad* 1861, 52: 1260-1264.
- Pethig R, Gascoyne PR, McLaughlin JA und Szent-Gyorgyi A. Ascorbate-quinone interactions: electrochemical, free radical, and cytotoxic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, 80(1): 129-132.
- Pfeiffer T, Schuster S und Bonhoeffer S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 2001, 292(5516): 504-507.

- Pyla R, Poulouse N, Jun JY und Segar L. Expression of conventional and novel glucose transporters, GLUT1, -9, -10, and -12, in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013, 304(6): C574-589.
- Racker E. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem* 1974, 5(1-2): 17-23.
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X und Choi AM. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2007, 9(1): 49-89.
- Saiko P, Ozsvar-Kozma M, Madlener S, Bernhaus A, Lackner A, Grusch M, Horvath Z, Krupitza G, Jaeger W, Ammer K, Fritzer-Szekeres M und Szekeres T. Avemar, a nontoxic fermented wheat germ extract, induces apoptosis and inhibits ribonucleotide reductase in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett* 2007, 250(2): 323-328.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2012, 33(4): 207-214.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993, 215(2): 213-219.
- Sievers EL und Senter PD. Antibody-drug conjugates in cancer therapy. *Annu Rev Med* 2013, 64: 15-29.
- Spitzbart H und Schmidt F. Results of in vitro culturing of ovarian neoplasms and testing with cytostatic agents. *Zentralbl Gynakol* 1970, 92(7): 201.
- Sweet S und Singh G. Accumulation of Human Promyelocytic Leukemia (HL-60) Cells at Two Energetic Cell Cycle Checkpoints. *Cancer Res* 1995, 55(22): 5164-5167.
- Szende B, Marcsek Z, Kocsis Z und Tompa A. Effect of Simultaneous Administration of Avemar® and Cytostatic Drugs on Viability of Cell Cultures, Growth of Experimental Tumors, and Survival Tumor-Bearing Mice. *Cancer Biother Radiopharm* 2004, 19(3): 343-349.
- Tai CJ, Wang W-C, Wang C-K, Wu C-H, Yang M-D, Chang Y-J, Jian J-Y und Tai C-J. Fermented wheat germ extract induced cell death and enhanced cytotoxicity of cisplatin and 5-fluorouracil on human hepatocellular carcinoma cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 2013: Article ID 121725.
- Upadhyay M, Samal J, Kandpal M, Singh OV und Vivekanandan P. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther* 2013, 137(3): 318-330.
- Vander Heiden MG, Cantley LC und Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009, 324(5930): 1029-1033.
- Vaupel P und Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007, 26(2): 225-239.
- Veech R, Eggleston L und Krebs H. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver. *Biochem J* 1969, 115: 609-619.

- Waddell TG, Repovic P, Meléndez-Hevia E, Heinrich R und Montero F. Optimization of glycolysis: new discussions. *Biochem Educ* 1999, 27(1): 12-13.
- Wall BA, Shin S-S und Chen S. Glutamate Signaling in Human Cancers. In: Davids LM (ed.) *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma* 2013. InTech.
- Warburg O. Über die Entstehung der Krebszellen. *Naturwissenschaften* 1955, 42(14): 401-406.
- Warburg O und Minami S. Versuche an Überlebendem Carcinom-gewebe. *J Mol Med* 1923, 2(17): 776-777.
- Weinberg F und Chandel NS. Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2009, 1177(1): 66-73.
- Yu X, Vazquez A, Levine AJ und Carpizo DR. Allele-specific p53 mutant reactivation. *Cancer Cell* 2012, 21(5): 614-625.
- Zhukov NV und Tjulandin SA. Targeted therapy in the treatment of solid tumors: practice contradicts theory. *Biochemistry (Mosc)* 2008, 73(5): 605-618.

Eigene Publikationen

Hahlbrock T, Karaaslan F, Mühling B, Schneider M, Germer C-T, Otto C. Das supportiv-onkologische Naturprodukt Avemar induziert Apoptose in malignen Zellen durch Induktion von oxidativen Stress oder durch Hemmung des Energiestoffwechsels. *Poster auf der 89. Jahrestagung der Vereinigung Bayerischer Chirurgen e.V. vom 25. – 27. Juli 2012 in Regensburg.*

Eich K, **Hahlbrock T**, Karaaslan F, Schneider M, Mühling B, Germer C-T, Otto C. The anticancer Effect of the nontoxic fermented wheat germ extract Avemar on gastrointestinal tumor cell lines is mediated by oxidative stress and metabolic inhibition. *Vortrag auf den 16. Chirurgischen Forschungstagen vom 4. – 6. Oktober 2012 in Regensburg.*

Otto C, **Hahlbrock T**, Eich K, Karaaslan F, Germer C-T, Wiegering A, Kämmerer U. Antiproliferative and antimetabolic effects behind the anticancer property of fermented wheat germ extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2016, 16:160.

Danksagung

Mein großer Dank gilt zu allererst Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto. Eine hervorragende Betreuung ermöglichte diese Arbeit und ließ sie durch viele Diskussionen und konstruktive Hilfe gelingen. Sowohl bei der Planung, als auch bei der Durchführung und kritischen Auswertung der Versuche stand Prof. Otto jederzeit als Ansprechpartner unterstützend zur Seite.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Christoph-Thomas Germer, Chirurgische Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Frau Bettina Mühling, Frau Manuela Hofmann, Frau Monika Koospal und Frau Sabine Gahn, die mich nicht nur in die verschiedenen experimentellen Arbeitsmethoden eingearbeitet haben, sondern mir auch bei der Durchführung der Experimente jederzeit mit Rat und Tat beiseite standen.

Danken möchte ich weiterhin meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihr Verständnis bei Höhen und Tiefen des Studiums und der Doktorarbeit. Ein besonderer Dank geht an Stefan, dessen Diskussionsfreudigkeit, stetige Hilfe und motivierende Worte maßgeblich zur Vollendung der Arbeit beigetragen haben.

Bei der Medizinischen Fakultät und der GSLS (Graduiertenschule für Lebenswissenschaften) möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit bedanken.

Lebenslauf

Ausbildung

- seit 01/2015 Assistenzärztin der Medizinischen Klinik des Spitals Bülach (CH)
- 11/2013 Staatsexamen Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (D)
- 09/2011-07/2016 Doktorarbeit am Zentrum für Operative Medizin (ZOM), Arbeitsgruppe Tumorstoffwechsel, Betreuung durch Prof. Dr. rer. nat. C. Otto, Universitätsklinikum Würzburg (D)
- 09/2010 - 04/2011 Auslandssemester an der Université Joseph Fourier, Grenoble (F)
- 04/2007 - 11/2013 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (D)
- 09/2006 - 12/2006 Deutsch-französisches Europalehramt-Studium an der PH Freiburg (D)
- 10/2005 - 08/2006 Studium Generale am Leibniz Kolleg Tübingen (D)
- 09/1998 - 06/2005 Gymnasium Dinkelsbühl, Gymnasium Bad Aibling (D)
Allgemeine Hochschulreife (06/2005)

Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache), Englisch (sehr gut), Französisch (sehr gut), Spanisch (Grundkenntnisse)