

Bericht 2017

**Speziallabor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde
Forschungsprogramm für Rezeptorbiochemie und Tumorstoffwechsel
Paracelsus Medizinische Privatuniversität Salzburg**

**erstellt von a.o.Univ.Prof.Dr. Barbara Kofler
28. Mai 2018**

Projekt: Veränderungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels in verschiedenen Tumorerkrankungen

Tumorentstehung ist bei Mensch und Tier mit einschneidenden Veränderungen im Zellstoffwechsel verbunden. Dabei kommt es unabhängig von der Stoffwechsellage des Ursprungsgewebes, aus dem der Tumor hervorgegangen ist, bei bestimmten Stoffwechsel-Parametern immer zu ähnlichen Veränderungen.

Eines der tumor-spezifischen Stoffwechsel-Merkmale ist die vermehrte Umsetzung von Glucose zu Milchsäure (Lactat) in Gegenwart von Sauerstoff, die zum ersten Mal von Otto Heinrich Warburg im Jahre 1924 beschrieben wurde und als „Warburg-Effekt“ bezeichnet wird. Die meisten Gewebe, wie z.B. der Muskel beschreiten diesen Weg der Energiegewinnung in der Regel nur unter Sauerstoffmangel. In Gegenwart von Sauerstoff verstoffwechseln Gewebe die Glucose über die Glycolyse, den Citratzyklus und die zelluläre Atmung zu Kohlendioxid und Wasser und gewinnen dabei pro Mol Glucose 38 Einheiten des zellulären Energieträgers ATP. Demgegenüber liefert die Umsetzung von Glucose zu Lactat nur 2 Einheiten ATP. Diese offenbare Verschwendung von Energie veranlasste Otto Warburg zu der Hypothese, dass in Tumorzellen ein Defekt in der mitochondrialen Atmung die Ursache für die vermehrte Lactat-Produktion in Gegenwart von Sauerstoff sein müsse. Im Vergleich zur Zellatmung ist die Milchsäuregärung energetisch zwar sehr ungünstig, doch sichern Tumorzellen ihren Energiebedarf durch eine 20 bis 30-fach höhere Zuckeraufnahme, als sie bei gesunden Zellen zu finden ist. In der klinischen Diagnostik wird diese gesteigerte Zuckeraufnahme von Tumoren mit der Positronen-Emissions-Tomografie (PET) gemessen.

In unseren Arbeiten konnten wir zeigen, dass nahezu alle Tumoren diese energetischen Veränderungen bzw. den Warburg Effekt zeigen (Feichtinger et al. 2018) - unter anderem auch Neuroblastome und Wilms Tumoren (Aminzadeh et al. 2015). Die genauen Mechanismen, wie es zu einer Selektion von Zellen mit Schäden in der aeroben Energieproduktion kommt, wurde unter anderem im Rahmen des 7. Rahmenprogramms der EU, dem Marie Curie International Training Network-MEET mit Partnern aus Italien (Koordination), UK, Niederlande, Spanien und Deutschland analysiert (2012-2016). Im Zuge eines unserer Projekte und des MEET Projektes wurde die Rolle von mitochondrialen Mutationen im Komplex I der Atmungskette im Detail analysiert (Zimmermann et al. 2018). Dabei konnten wir zeigen, dass der Verlust des Komplex I in Tumorzellen mit einem benignen Verhalten assoziierte ist (Kurelac et al. submitted).

Im Nachfolgeprojekt **TRANSMIT** (2017-2020) steht der mitochondriale Stoffwechsel von Tumoren noch stärker im Fokus der einzelnen Projektteile. Prof. Kofler ist in diesem Projekt Leiterin des Arbeitspaketes, welches sich mit therapeutischen Ansätzen, die den Tumormetabolismus betreffen, auseinandersetzt.

Kooperationen

- **Universitätsklinik Göttingen, Institut für Humangenetik Prof. Dr. Heidi Hahn** „Energiemetabolismus im Rhabdomyosarkom“
- **Karolinska Institut, Stockholm, Schweden Prof. Dr. Marie Henriksson** „Aerober Energiemetabolismus des Neuroblastoms in Abhängigkeit der N-Myc Amplifikation“
- **Paracelsus Medizinische Universität, Innere Medizin Hämatologie und Onkologie, Nürnberg, Prof. Dr. Martin Wilhelm** „Veränderungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels in Leukämien“
- **Universität Bologna: Prof. Giuseppe Gasparre, Dr. Anna Maria Pocelli:** „Effekt von Komplex I Defizienzen in soliden Tumoren“
- **Pathologie SALK Salzburg, Assoc. Prof. Dr. Daniel Neureiter, Univ. Doz. Cornelia Hauser-Kronberger** „Regulation des aeroben Energiestoffwechsels in soliden Tumoren“
- **Universitätsklinik für Dermatologie, SALK (Univ. Prof. Johann Bauer, Assoc. Prof. Roland Lang; Assoc. Prof. Martin Laimer)** „Metabolische Veränderungen in Hauttumoren“

Projekt: Ketogene Diät zur Behandlung von soliden Tumoren

Stehen kaum Kohlenhydrate und Zucker (Glukose) und stattdessen Fett über die Nahrung zur Verfügung, wie bei einer ketogener Diät (KD) oder Atkins Diät, bildet die Leber aus Fett sogenannte Ketonkörper. Diese versorgen vor allem die Mitochondrien der Gehirnzellen (zu denen kein Fett gelangen kann) anstelle von Glukose für die Energieproduktion. Für gesunde Zellen sind Ketonkörper eine besonders gute Energiequelle.

Gegenteilig wirkt sich diese Ernährungsform jedoch auf Krebszellen aus. Deren Stoffwechsel ist, wie wir in Projekt I vielfach zeigen konnten, verändert, wobei vor allem Glukose und einige Aminosäuren verstoffwechselt werden. Die Ketonkörper, wie sie bei ketogener Diät gebildet werden, bringen Tumorzellen dabei jedoch viel zu langsam Energie.

Zucker kann aber auch zusätzlich aus dem umliegenden Gewebe in die Zellen gelangen. Das ist der Fall, wenn der Blutzuckerspiegel hoch ist. Auch diesen Mechanismus verhindert

die ketogene Diät weitgehend: Sie senkt den Blutzuckerspiegel auf Nüchternniveau. Die Folge: Das Krebsgewebe kann nicht mehr wachsen, schrumpft im besten Fall sogar (siehe Editorial Weber DD et al. 2018).

Eine große Schwierigkeit liegt jedoch darin, dass eine ketogene Diät eine Ganz-oder-Gar-nicht-Lösung darstellt. Die günstige Wirkung tritt erst dann ein, wenn die Glykogenspeicher leer sind und die aufgenommene Kohlenhydratmenge unterhalb der individuellen Schwelle liegt, bei der die Ketonkörperproduktion anspringt.

Durch eine Würzburger Arbeitsgruppe wurde eine sehr gute Verträglichkeit der ketogenen Diät bei Tumorpatienten mit metastasierender Krankheit unterschiedlicher Entitäten nachgewiesen. Einzelbeobachtungen in Tiermodellen und an Tumorpatienten, die bereits eine ketogene Diät erhalten haben, zeigten, dass diese Form der Ernährung das Fortschreiten einer Tumorerkrankung aufhalten oder zumindest verlangsamen konnte (Weber DD et al. 2018). Derzeit finden sich 23 klinische Studien im Register für klinische Studien, welche den Effekt der ketogenen Diät auf verschiedenste adulte Tumoren untersuchen (<https://clinicaltrials.gov>).

Ketogene Diät in einem präklinischen Neuroblastommodell

Wir haben den Therapieansatz mit einer ketogenen Diät für das Neuroblastom im Tiermodell angewendet. Dazu wurden Tumoren aus humanen Neuroblastomzellen in Mäusen erzeugt und das Wachstum der Tumoren unter ketogener Diät in Kombination mit oder ohne Chemotherapie beobachtet.

Die subkutane Injektion der SH-SY5Y Neuroblastomzellen resultierte im Wachstum eines lokalen soliden Tumors. Der Start der Ernährungstherapie und die randomisierte Zuordnung in die Therapiegruppen erfolgte bei einer Tumorgöße von 150 mg in vier Gruppen: 1) Standarddiät ad libidum (SD), 2) Standarddiät kalorienreduziert (SD-KR), 3) ketogene Diät (KD) und 4) kalorienreduzierte ketogene Diät (KD-CR). Das Tumolvolumen wurde über eine Zeitdauer von 21 Tagen verglichen.

Gegenüber der Standarddiät ad libidum kam es zu einer hoch signifikanten Reduktion des Tumolvolumens in den Mäusen welche ketogen und/oder kalorienreduziert ernährt wurden (Morscher et al. 2015). Mithilfe einer niedrig dosierten Chemotherapie mit Cyclophosphamide kann man das Neuroblastomxenograft- Wachstum signifikant reduzieren. Die adjuvante Therapie durch eine ketogenen Diät (2 Teile Fett: 1 Teil Protein und Kohlenhydrate) und / oder Kalorienrestriktion führte zu einer weiteren Inhibition des Wachstums, wobei die Kombination von ketogenen Diät mit Kalorienrestriktion zu einem Stillstand des Tumorstadiums führte und in einigen Fällen sogar eine Remission erreicht wurde (Morscher et al. 2016).

Da eine Kalorienreduktion einem Großteil von Tumorpatienten nicht zugemutet werden kann, wurde in einer weiteren präklinischen Studie der Fettgehalt der ketogenen Diät erhöht (8 Teile Fett zu 1 Teil Protein und Kohlenhydrate) und die Fettzusammensetzung variiert. Dadurch ist es gelungen das Wachstum von humanen Neuroblastomen unter niedrigdosierter Chemotherapie in Nacktmäusen zum Stillstand zu bringen, wenn die ketogene Diät mit mittelkettigen Fettsäuren, wie sie im Kokosöl vorkommen, versetzt wurde. Damit kann auf eine kombinierte Kalorienrestriktion verzichtet werden (Abb. 1; Aminzadeh et al. 2017).

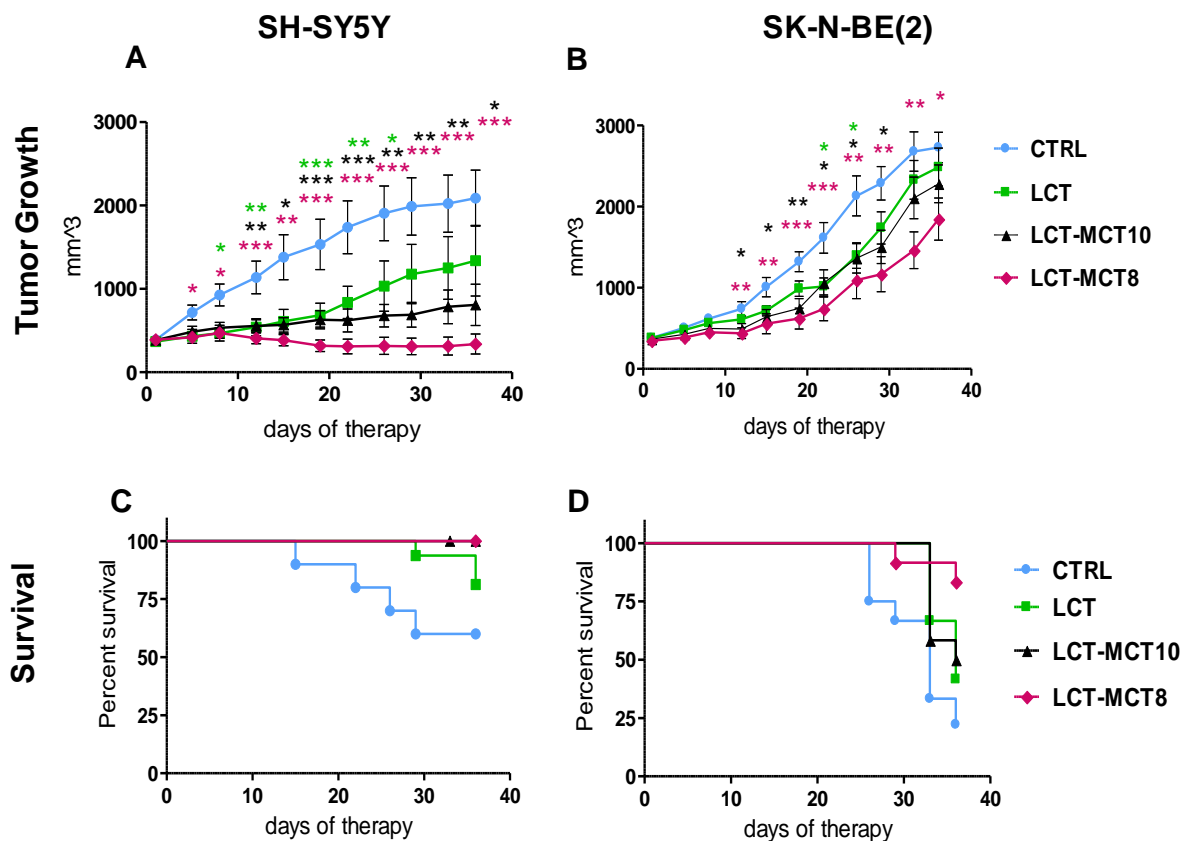


Abb. 1 Das Wachstum von Neuroblastomtumoren aus (A) SH-SY5Y and (B) SK-N-BE(2) Neuroblastomzellen wurde durch eine Kombination von einer niedrig dosierten Chemotherapie mit Cyclophosphamid mit einer mit mittelkettigen Fettsäuren angereicherten ketogenen Diät (LCT-MCT8) effektiv gehemmt und somit auch das Überleben signifikant verlängert (C) SH-SY5Y und (D) SK-N-BE(2) Xenografts. (CTRL, LCT and LCT-MCT10 n = 10-12; LCT-MCT8 n = 11-12). *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001. CTRL: Standarddiät; LCT: ketogene Diät mit langkettigen Fettsäuren, LCT-MCT8: ketogene Diät angereichert mit mittelkettigen Fettsäuren (8 Kohlenstoffeinheiten), LCT-MCT10: ketogene Diät angereichert mit mittelkettigen Fettsäuren (10 Kohlenstoffeinheiten). Adaptiert von (Aminzadeh et al. 2017).

Diese Daten zeigen, dass die Zusammensetzung der ketogenen Diät eine wichtige Rolle spielt. Daher wird in folgenden Projekten weiter an der optimalen Zusammensetzung der Fette gearbeitet, um eine ketogene Diät mit möglichst geringem Fettanteil und gleichzeitig

möglichst hoher Wirksamkeit zu entwickeln. Je geringer die ketogene Last in der Diät ist, umso einfacher sollte es für Patienten sein die Diät einhalten zu können und eventuelle Nebenwirkungen vermieden werden. Unsere Daten zeigen, dass der Effekt einer 8:1 ketogenen Diät auf die Höhe der Ketonkörper im Blut von Mäusen ähnlich ist wie der Effekt einer 2:1 ketogenen Diät im Menschen. Eine 2:1 ketogene Diät ist sehr gut verträglich und hat, wie bereits in einigen Studien gezeigt, daher keine Einschränkung der Lebensqualität zur Folge.

Ketogene Diät in einem präklinischen Nierenzellkarzinommodell

Neuroblastome und Nierenzellkarzinome weisen in Bezug auf die aerobe Energieproduktion dieselben Veränderungen auf. Daher wurde in einem weiteren Projekt dieselbe ketogene Diät (8:1) auf Nierenzellkarzinome angewendet. Hier zeigte sich ebenfalls, dass die ketogene Diät das Tumorstadium verlangsamen kann, jedoch wurde bei den Mäusen mit Nierenzellkarzinom unter ketogener Diät beobachtet, dass sie dramatisch an Gewicht verloren. In der Analyse der Daten zeigte sich, dass Nierenzellkarzinome dazu neigen, eine Entzündung der Leber zu induzieren. Dieser Umstand zusammen, mit der für die Leber doch etwas belastenden ketogenen Diät führte zu einer dramatischen Verstärkung der Entzündung der Leber und daher zu einer Verringerung des Überlebens (Vidali et. al. 2017). Diese Daten zeigen, dass die Wirkung der ketogenen Diät unbedingt für jede Tumorart zuerst in präklinischen Modellen auf ihre Wirkung und Sicherheit getestet werden muss.

Weitere Tumorarten werden im Zuge des EU International Training TRANSMIT getestet. Erste Daten aus dem Projekt zeigen, dass Melanome mit unterschiedlicher Genetik (BRAF V600E Mutation, Zellen ohne diese Mutation) im Mausmodell eine signifikante Reduktion des Tumorstadiums unter ketogener Diät zeigen.

Kooperationen

- **TRANSMIT: International Training Network** Koordinator Prof. Anna-Maria Pocelli (Bologna), weitere Partneruniversitäten aus Frankreich, Deutschland, Schweden, UK
- **Universitätsklinik für Dermatologie: Prof. Johann Bauer, Dr. Peter Kölblinger, Dr. Tobias Welponer; CRCS: Prof. Florian Lagler**

„N=1-Studie zur Evaluierung der Durchführbarkeit und Verträglichkeit von ketogener Diät bei Tumorerkrankungen der Haut“

Projekt: Rolle von Neuropeptid Galanin in Hirntumoren

Neuropeptide sind kurze regulatorische Peptide (Eiweishormone), welche als Botenstoffe fungieren und im gesamten Körper zu finden sind. Die Wirkung der Neuropeptide wird über Bindung an spezifische Rezeptoren vermittelt (Schlüssel-Schloss Prinzip). Dabei sind Neuropeptide auch für die Entwicklung und das Wachstum von Nerven von essentieller Bedeutung. Da Neuropeptide das Wachstum von Nervenzellen steuern, sind Veränderungen in ihrer Menge möglicherweise beim Entstehen von neuronalen Tumoren von Bedeutung (EXS. 2010;102:223-41).

Das Neuropeptid Galanin kommt sowohl im zentralen und peripherischen Nervensystem vor. Es regelt zahlreiche physiologische und pathologische Prozesse durch seine Wechselwirkungen mit drei verschiedenen Rezeptoren (GAL1-3). Es wird nicht nur Galanin selbst, sondern auch seine Rezeptoren in verschiedensten peripheren Tumoren gefunden. Trotz der weiten Verbreitung von Galanin im Gehirn gibt es nur wenige Studien, welche die Rolle dieses Eiweishormons in Hirntumoren untersuchen. Wir konnten nachweisen, dass Galanin und dessen Rezeptoren in Zelllinien von verschiedenen Hirntumoren produziert werden. In Zusammenarbeit mit Prof. Weis von der Neuropathologie in Linz, analysieren wir die Menge von Galanin und der einzelnen Rezeptoren in verschiedensten Tumoren des zentralen Nervensystems und korrelieren diese zu anschließend zu klinischen Daten und dem Therapieansprechen.

Kooperation

- **Neuropathologie Linz Prof. Serge Weis** „Das Galaninsystem in Hirntumoren – ein diagnostischer oder prognostischer Marker?“
- **Universitätsklinik Regensburg Prof. Peter Hau** „Effekt von Galanin auf Glioblastomzellen“

Projekt: Neuropeptide als Komponenten der körpereigenen angeborenen Abwehr

Im Rahmen vieler notwendiger Chemotherapien werden die Abwehrzellen des Immunsystems geschädigt. Daher ist es nötig die Aktivität der verbleibenden Zellen soweit als möglich zu optimieren.

An der Abwehr von Infektionen ist eine Reihe von Immunzellen beteiligt. Am Beginn von Infektionen nehmen die neutrophilen Granulozyten im Blut besonders rasch zu ("neutrophile Kampfphase"). Sie "fressen" (phagozytieren) Bakterien und Gewebetrümmer. NK-Zellen (natürliche Killerzellen) gehören zu den Lymphozyten (Untergruppe der weißen Blutzellen

oder Leukozyten). Sie sind in der Lage, abnormale Zellen wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen zu erkennen und abzutöten. NK-Zellen besitzen keine Antigen-spezifischen Rezeptoren und gehören ebenfalls zum angeborenen Immunsystem.

Es zeigt sich zunehmend, dass Komponenten des Gehirns und des Nervensystems mit Immunzellen interagieren. Daher haben wir den Einfluss des Neuropeptids Galanin auf Neutrophile, natürliche Killerzellen, Monozyten und Makrophagen analysiert. Wir konnten dabei nachweisen, dass Galanin in der Lage ist, die Aktivierung von all diesen Immunzelltypen zu modulieren. Vor allem die Modulation der Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung während der Differenzierung und Polarisierung von Makrophagen spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort.

Um sich vor den Makrophagen zu schützen, haben Tumorzellen eine Überlebensstrategie entwickelt: Sie manipulieren die Immunzellen so, dass diese ihre Anti-Tumorwirkung verlieren. Hierbei spielt vor allem die Polarisierung der Makrophagen eine wichtige Rolle. Wir konnten nachweisen, dass Galanin die Ausscheidung einer Reihe von Zytokinen in der Polarisierung der Makrophagen beeinflusst. Weitere Studien werden zeigen, ob durch Beeinflussung des Galanin Systems die Anti-tumoraktivität der Makrophagen beeinflusst werden kann.

Publikationen 2017/18

Originalarbeiten

Zimmermann FA, Neureiter D, Sperl W, Mayr JA, Kofler B (2018) Alterations of Oxidative Phosphorylation Complexes in Papillary Thyroid Carcinoma. *Cells*. 2018 May 9;7(5).

Weber DD, Aminazdeh-Gohari S, & Kofler B (2018) Ketogenic diet in cancer therapy. *Aging (Albany NY)* 10(2):164-165. doi: 10.18632/aging.101382

Feichtinger RG, Lang R, Geilberger R, Rathje F, Mayr JA, Sperl W, Bauer JW, Hauser-Kronberger C, Kofler B, & Emberger M (2018) Melanoma tumors exhibit a variable but distinct metabolic signature. *Exp Dermatol* 27(2):204-207. doi: 10.1111/exd.13465

Vidali S, Aminzadeh-Gohari S, Feichtinger RG, Vatrinet R, Koller A, Locker F, Rutherford T, O'Donnell M, Stoger-Kleiber A, Lambert B, Felder TK, Sperl W, & Kofler B (2017) The ketogenic diet is not feasible as a therapy in a CD-1 nu/nu mouse model of renal cell carcinoma with features of Stauffer's syndrome. *Oncotarget* 8(34):57201-57215. doi: 10.18632/oncotarget.19306

Koller A, Bianchini R, Schlager S, Munz C, Kofler B, & Wiesmayr S (2017) The neuropeptide galanin modulates natural killer cell function. *Neuropeptides* 64:109-115. doi: 10.1016/j.npep.2016.11.002

Feichtinger RG, Neureiter D, Skaria T, Wessler S, Cover TL, Mayr JA, Zimmermann FA, Posselt G, Sperl W, & Kofler B (2017) Oxidative Phosphorylation System in Gastric Carcinomas and Gastritis. *Oxid Med Cell Longev* 2017:1320241. doi: 10.1155/2017/1320241

Aminzadeh-Gohari S, Feichtinger RG, Vidali S, Locker F, Rutherford T, O'Donnel M, Stoger-Kleiber A, Mayr JA, Sperl W, & Kofler B (2017) A ketogenic diet supplemented with medium-chain triglycerides enhances the anti-tumor and anti-angiogenic efficacy of chemotherapy on neuroblastoma xenografts in a CD1-nu mouse model. *Oncotarget* 8(39):64728-64744. doi: 10.18632/oncotarget.20041

