



Bericht 2022/23

**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
3. Juni 2023**

Präambel

Das Forschungsprogramm für Rezeptorbiochemie und Tumormetabolismus der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität (PMU) wurde 2009 gegründet und befindet sich in den Forschungs- und Speziallabors der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde. Aufgrund des breiten Fachwissens des Labors wurde beschlossen, sich auf zwei wissenschaftliche Themen zu konzentrieren: Neuroendokrinologie / Rezeptorbiochemie und Tumormetabolismus.

Auf dem Gebiet der Rezeptorbiochemie wird das therapeutische Potenzial von regulatorischen (Neuro-) Peptiden der Galaninfamilie in Tumorerkrankungen, Immunität und entzündlichen Erkrankungen untersucht.

Das zweite Thema basiert auf der eingehenden Analyse der Veränderungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels (Warburg-Effekt) bei soliden Tumoren. Basierend auf diesen Daten werden verschiedenste metabolische Therapiestrategien getestet, welche die klassischen Therapieansätze bei der Behandlung von Tumoren unterstützen sollen.

Das Forschungsprogramm für Rezeptorbiochemie und Tumorstoffwechsel wurde im Zuge der Evaluierung der Institute and Forschungsprogramme der Paracelsus Medizinischen Universität (PMU) durch eine internationale wissenschaftliche Fachjury im Auftrag des Fonds zur Förderung zur wissenschaftlichen Forschung (FWF) Anfang 2019 evaluiert. Dabei wurde von den Gutachtern hervorgehoben, dass das Thema des Tumormetabolismus ein besonderes Highlight in der Forschungslandschaft der PMU darstellt und das Forschungsprogramm insgesamt exzellent, international kompetitiv/anerkannt sowie wissenschaftlich innovativ ist.

Projekt: Metabolische Therapie von soliden Tumoren

Das Neuroblastom ist einer der häufigsten soliden Tumore bei Kindern. Neuroblastome treten in der frühen Kindheit auf und präsentieren sich typischerweise als große abdominelle Tumore, die eng mit der Nebenniere assoziiert sind. In den letzten Jahren haben die Ergebnisse internationaler klinischer Neuroblastom-Studien gezeigt, dass es trotz intensiver Forschungsanstrengungen in der Neuroblastom-Therapie und trotz des Einsatzes multimodaler Behandlungsstrategien, keine signifikante Abnahme der Mortalität von Hochrisikopatienten gab. Häufig leiden Überlebende einer Krebserkrankung im Kindesalter an vielen Nebenwirkungen, die aus den Standard-Krebstherapien resultieren. Adjuvante Therapieschemata können die Wirksamkeit einer multimodalen Anti- Neuroblastom-Therapie verbessern, ihre Toxizität minimieren und die Lebensqualität der Patienten erhöhen. Unsere früheren Studien haben gezeigt, dass die ketogene Diät (KD), eine fettreiche/kohlenhydratarms Diät mit adäquatem Proteingehalt, allein oder in Kombination

mit einer niedrig dosierten Chemotherapie das Tumorwachstum signifikant hemmt oder verlangsamt und die Überlebensrate in Neuroblastom-Xenograft-Modellen verlängert.

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 ist sind Ketonkörper eine besonders gute Energiequelle.

Gegenteilig wirkt sich diese Ernährungsform jedoch auf Krebszellen aus. Deren Stoffwechsel ist, wie wir 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 Übersichtsarbeit Weber DD et al. 2020).

Das Gesamtüberleben von Neuroblastom Hochrisikopatienten hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten auf 50% verbessert. Das verbesserte Ergebnis für Hochrisiko-Neuroblastom-Patienten ist auf die Intensivierung der Chemotherapien, die Myeloablation, Isotretinoin und die Immuntherapie zurückzuführen. Allerdings erleiden etwa 50% der Kinder mit Hochrisiko-Neuroblastom nach einer ersten Remission einen Rückfall aufgrund MRD (einer minimalen Resterkrankung) und/oder Neuroblastom-Tumor-initiierender Zellen. Die derzeitige Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms wird in den meisten Einrichtungen in drei Phasen unterteilt: Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie. Erhaltungstherapien, zu denen auch die Immuntherapie gehört, werden zur Behandlung von MRD und Neuroblastom-Tumorinitiatorzellen eingesetzt. Darüber hinaus haben viele Überlebende von Krebserkrankungen im Kindesalter eine hohe Morbidität aufgrund der Nebenwirkungen intensiver Therapien, die noch Monate oder Jahre nach der Behandlung auftreten können. Um all diese Herausforderungen bei der Neuroblastomtherapie zu bewältigen, kann die Anwendung von adjuvanten Behandlungsschemata sinnvoll sein, um die Wirksamkeit der Anti-Neuroblastom-Therapie zu verbessern, ihre Toxizität zu minimieren und die Lebensqualität der Patienten zu verbessern.

Die Kombination von zwei oder mehr therapeutischen Strategien kann zu einer größeren Wirksamkeit bei der Behandlung von Krebs führen. Synergistische Therapien verstärken die Wirkung der jeweils anderen, was zu einer besseren Wirksamkeit gegen Krebszellen führt, während die Wirkstoffkonzentrationen niedriger sein können als bei herkömmlichen

Monotherapien. Diese niedrigen Konzentrationen wiederum können die Toxizität des Medikaments für gesunde Zellen verringern. Eine wachsende Zahl von Studien deutet darauf hin, dass die KD in Kombination mit konventionellen Krebsbehandlungen synergistisch wirken kann. Unsere früheren Studien haben gezeigt, dass eine diätetische Intervention mit KD die Wirksamkeit der klassischen Neuroblastom-Chemotherapie (niedrige Dosis von metronomischem Cyclophosphamid) bei immundefizienten nu/nu-Mäusen synergistisch verstärkt.

Effekt von Metformin auf den Anti-Neuroblastom-Effekt einer ketogenen Diät

In unseren laufenden Projekten untersuchen wir ob Inhibitoren der Zellatmung den Effekt der KD in der Behandlung von verschiedenen Tumoren verstärken kann. Die Hemmung unterschiedlicher tumorspezifischer Stoffwechselfvorgänge mit Medikamenten welche bereits für andere Anwendungen am Markt sind, haben erhebliches Potential in der Tumorthherapie (Review Aminzadeh-Gohari et al. 2020).

Neuere Studien legen nahe, dass die Hemmung der bereits sehr geringen Atmung von Tumorzellen bei der Krebsbehandlung von Vorteil sein kann. Da das Antidiabetikum Metformin (MET) den Blutzuckerspiegel senkt und auch einen Teil der Proteine, welche für die Atmung von Zellen verantwortlich sind, hemmt, haben wir untersucht ob MET die wachstumshemmenden Effekte der KD auf Neuroblastomen (NB) verstärken könnte.

Um festzustellen, ob MET die mitochondriale Funktion beeinflusst, wurden Neuroblastomzellen mit MET behandelt, und die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) wurde mittels metabolischer Flussanalyse (Seahorse XF) gemessen. Die mitochondriale Atmung wurde durch MET in hoch-malignen NB-Zellen gehemmt. NB-Xenografts wurden in Nacktmäusen mit NB-Zellen etabliert. MET allein zeigte keine signifikante Wirkung auf das Wachstum der NB-Xenografts. In Kombination mit einer niedrig dosierten Chemotherapie (CP) verstärkte MET jedoch die proliferationshemmende Wirkung einer KD. Die Dreifachtherapie (MET+CP+KD) führte in den Xenotransplantationsmodellen auch zu einer Verlängerung der Überlebenszeit.

Zusätzlich wurde das gesamte Transkriptom der behandelten Tumore Analyse bestimmt und bioinformatisch ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass die Kombinationstherapie MET+CP+KD vor allem einen Einfluss auf den Fett und Glukosestoffwechsel der Tumore hat.

Weiters werten wir derzeit den Effekt der Kombinationstherapie auf die Metabolite im Plasma und den Tumoren aus, um zu zeigen, welche Mechanismen für den Anti-Tumor Effekt der Kombinationstherapie verantwortlich zeigen.

Metabolische Therapie zur Behandlung des Neuroblastoms im immunkompetenten

TH-MYCN Allograft Mausmodell

Aufgrund des fehlenden Immunsystems in NU/NU-Mäusen sind menschliche Xenotransplantate für eine Immuntherapie grundsätzlich ungeeignet. Daher werden wir in einem immunkompetenten Mausmodell metabolische Kombinationstherapien testen. Hierbei werden wir Neuroblastomzellen aus einem genetischen Mausmodell (TH-MYCN) verwenden welche eine Überproduktion von MYCN zeigen. Ist MYCN erhöht, ist eines der Hauptrisikofaktoren für eine schlechte Prognose bei NB Patienten. Die TH-MYCN NB Zellsuspensionen werden in Tiere mit einem kompetentes Immunsystem verfügen transferriert (TH-MYCN Allografts). Mit diesem Tiermodell kann untersucht werden, ob die Wirksamkeit der KD in Kombination mit einer Immuntherapie zu einem synergistischen Effekt bei der Unterdrückung des Neuroblastomwachstums und der Verlängerung des Überlebens führen kann. In immunkompetenten Tieren kann auch die Wirkung der Therapie auf die Mikroumgebung des Tumors, insbesondere auf tumorassoziierte Immun- und Entzündungszellen, analysiert werden. Tumorassoziierte Immun- und Entzündungszellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Tumorentwicklung, dem Wachstum, der Progression und der Therapieresistenz.

Daher wollen wir die Wirkung von KD in Kombination mit Immuntherapie und/oder niedrig dosierter Chemotherapie auf das Wachstum von Neuroblastomen in einem immunkompetenten, syngenen Allograft Modell der TH-MYCN Tumore untersuchen. Die Ziele dieses Projekts lauten wie folgt:

Ziel 1: Unser erstes Ziel ist es, unsere früheren Ergebnisse, dass die KD als nichttoxische Therapie Tumorzellen für die Chemotherapie sensibilisieren kann, in immunkompetenten TH-MYCN Allografts zu bestätigen. Mausmodelle können den menschlichen Krebs nicht genau imitieren. Manchmal zeigen verschiedene Mauskrebsmodelle aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrunds und der Mikroumgebung des Tumors unterschiedliche Ergebnisse. Da die Translation von Krebsstudien an Tieren in die Klinik in der Regel kompliziert ist, müssen die Ergebnisse einer neuen Therapie in verschiedenen Tiermodellen für eine Krebsart bewertet werden, um die Sicherheit klinischer Versuche zu gewährleisten. Die Bestätigung unserer früheren Ergebnisse würde die Hypothese unterstützen, dass die Verabreichung der KD an Neuroblastom-Patienten eine geringere Dosis oder weniger Zyklen der Chemotherapie erlauben könnte, wodurch die Morbidität, verursacht durch die Nebenwirkungen der Chemotherapie, verringert werden könnte.

Ziel 2. Abgesehen davon ist es unser Ziel, zu zeigen, dass die KD alleine oder in Kombination mit Chemotherapie synergistisch mit Immuntherapie in einem Induktionstherapie-Setting wirkt, um eine Regression des Neuroblastoms zu induzieren.

Ziel 3. Nach intensiven Behandlungen erreichen viele Neuroblastom-Patienten eine vollständige radiologische oder pathologische Remission, aber MRD und Neuroblastom-

Tumor initiiierende Zellen können noch weiter vorhanden sein, was zu einem Rückfall führen kann. Um festzustellen, ob KD in einem Erhaltungstherapieansatz mit Immuntherapie und Temozolomid (TMZ) Chemotherapie das Tumorwachstum reduzieren kann und somit indirekt auch potentiell einen Neuroblastom-Rückfall verhindern kann und in der Folge die Chance auf ein tumorfreies Überleben erhöht, haben wir entsprechende Therapieschemata in dem Mausmodell geplant.

Kooperationen

- **Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital, London UK:** (Lewis Chesler, Evon Poon)

Projekt: Effekt von Tumoren und ketogener Diät auf Plasma Metabolite

Die Untersuchung des Metaboloms, des kompletten Satzes von Metaboliten, die in einer biologischen Probe gefunden werden, hilft zu verstehen, wie sich der Stoffwechsel zwischen gesunden und kranken Individuen unterscheidet. Tumore unterscheiden sich stark in ihrer Mutationslandschaft und ihrem Stoffwechsel. Das Verständnis dieser Unterschiede ist wichtig für die richtige Behandlung von Tumorpatienten. Das Ziel unserer Studie ist es, die Metabolome von genetisch unterschiedlichen Tumoren, welche in Mäuse transplantiert wurden, zu charakterisieren. Wir fanden heraus, dass sich Tumore, unabhängig vom Mutationsstatus, stark in ihren Lipidprofilen unterscheiden, die wichtige Metabolite für die Energieproduktion sind.

Bei Studien an Melanomen konnten wir sieben Metabolite identifizieren, die das Potenzial haben, gesunde von Melanom-tragenden Mäusen zu unterscheiden (Weber et al. 2020). Wir testen nun, ob die im Mausmodell entdeckten metabolomischen Unterschiede beim Menschen reproduzierbar sind und möglicherweise zu stoffwechselbasierten Therapieansätzen für Melanompatienten führen könnten.

Ähnliche Studien werden derzeit an Neuroblastomen aus den oben vorgestellten Projekten vorgenommen.

Kooperationen

- **Jaksons Laboratories USA, Maheshwor Thapa PhD**
- **Universitätsinstitut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (PD Dr. Thomas Felder)**

Projekt: Applikation ketogener Diät in Tumorpatienten

Zahlreiche präklinische Studien an verschiedenen Tiermodellen haben die Wirkung von kohlenhydratarmen Diäten auf das Krebswachstum untersucht, aber es gibt keine großen

randomisierten kontrollierten Studien oder prospektiven Kohortenstudien für Krebspatienten. Belege für die Verwendung von KDs als Ergänzung zur herkömmlichen Krebstherapie stammen überwiegend aus Anekdoten und Fallberichten. Die ersten klinischen Studien mit KD bei Patienten mit Glioblastom zeigten eine gute Akzeptanz und eine mögliche Anti-Tumor-Wirkung. Stoffwechseltherapien wie die KD gehören noch nicht zur Standardbehandlung von Krebspatienten. Viele Krebspatienten haben jedoch von sich aus begonnen, eine KD oder LC-Diät durchzuführen. Ziel unserer Studie war es, mit Hilfe eines Online-Fragebogens Informationen darüber zu sammeln, wie Krebspatienten eine KD- oder LC-Diät einführen, auf welche Ressourcen sie zurückgreifen, ob sie einen Nutzen der Diät für die Lebensqualität wahrnehmen und welche Faktoren die Durchführbarkeit und Einhaltung der Diät beeinflussen.

Die Rekrutierung der Teilnehmer erfolgte über Social-Media-Plattformen, Foren und kooperierende Ärzte (April 2018 bis November 2018). Um für die Studie in Frage zu kommen, mussten die Teilnehmer eine Krebsdiagnose haben und zum Zeitpunkt der Studienteilnahme eine KD- oder LC-Diät einhalten oder während der Krebsbehandlung eine KD- oder LC-Diät einhalten. Die Studienteilnehmer wurden gebeten, einen Online-Fragebogen auszufüllen. Die Fragen bezogen sich auf den aktuellen Gesundheitszustand des Teilnehmers, die Art der Krebserkrankung, die Zeit seit der Diagnose und das Behandlungsschema. Darüber hinaus wurden Fragen zur sozialen Unterstützung, zum Umfang der professionellen Beratung, zu den Ernährungspräferenzen und zur Lebensqualität gestellt. Insgesamt 96 Teilnehmer füllten den Fragebogen aus. Bei 73,4 % der Teilnehmer hatte der Tumor zum Zeitpunkt der Erstdiagnose noch keine Metastasen gebildet. Neunundfünfzig Prozent der Studienteilnehmer gaben an, dass sie während der Krebstherapie eine KD einhielten, 21 % hielten sich an eine kohlenhydratarme/fettreiche (LCHF) Diät und 12 % an eine Diät mit niedrigem glykämischen Index (LOGI). Fast die Hälfte der Studienteilnehmer hatte ihre ersten Informationen über KDs und LC-Diäten aus dem Internet bezogen.

Die KD- oder LC-Diät verbesserte bei mehr als zwei Dritteln der Studienteilnehmer die selbst eingeschätzte Lebensqualität. Die KD hatte eine normalisierende Wirkung auf das Körpergewicht. Die Mehrheit der Teilnehmer bewertete die Diät als leicht oder sehr leicht langfristig zu befolgen. Es gab eine offensichtliche Lücke zwischen dem Wunsch der Patienten nach professioneller Ernährungsberatung und dem, was derzeit von den Gesundheitsdienstleistern angeboten wird. In Zukunft sollte in Ernährungsexperten investiert werden, die in der KD geschult sind, um Krebspatienten bei der Umsetzung einer KD zu unterstützen.

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.

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.

Expression des Galanin Systems in Cholangiozellulärem Karzinom (CCA)

Galanin und GALRs werden in CCA-Geweben im Vergleich zu nicht-tumorösem Gewebe des Gallengangs analysiert. Die Expression des GAL-Systems wird auf zellulärer Ebene mittels IHC analysiert und auf mRNA Ebene validiert.

Um herauszufinden, ob GAL die Proliferation von CCA verändern kann, werden wir CCA-Zelllinien, die einen oder mehrere GALRs exprimieren, mit GAL behandeln und einen Zellebensfähigkeitstest durchführen.

Effekt von Galanin Rezeptor Agonisten auf das Wachstum von Pankreaskarzinom

Wir untersuchten das Potenzial von einem Aktivator von dem Galanin 2 Rezeptor als Therapeutikum für das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC). Dabei zeigen unsere, dass GAL2R ein sicheres und wertvolles therapeutisches Angriffsziel für die Behandlung von Patienten mit Pankreaskarzinom darstellt, wenn der Tumor eine hohe Konzentration von Galanin 2 Rezeptor aufweist. Der Anteil der Patienten, welche von einer solchen Therapie profitieren könnten wird derzeit untersucht.

Kooperation

- **Universitätsklinik für Chirurgie** PD. Dr. Martin Varga, Univ.Prof. Dr. Klaus Emmanuel, PD,
- **Universitätsklinik für Pathologie SALK Salzburg**, Univ.Prof. Karl Sotlar, Dr. Kraus
- **Department of Molecular Genetics, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, Holland** (Gert Moll).

Originalarbeiten

Metabolic Protein Kinase Signalling in Neuroblastoma W.J. Smiles, L. Catalano, V.E. Stefan, D.D. Weber, B. Kofler, in Revision

Metformin enhanced the effect of a Ketogenic diet in MYCN amplified Neuroblastoma xenografts . Catalano, S Aminzadeh-Gohari, DD Weber, R Poupardin, VE Stefan, WJ Smiles, J Tevini, RG Feichtinger, S Derdak, M Bilban, S Bareswill, MM Heimesaat, B Kofler, submitted

Galanin System in the Human Bile Duct and Perihilar Cholangiocarcinoma
S Huber, T. Fitzner, René G. Feichtinger, S Hochmann, T Kraus, K Sotlar, B Kofler, M. Varga, in Revision

Galanin 2 Receptor: a Novel Target for a Subset of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
P Namsolleck, B Kofler, G N Moll, in Revision

Dietary restriction in senolysis and prevention and treatment of disease.
Aminzadeh-Gohari S, Kofler B, Herzog C. Crit Rev Food Sci Nutr. 2022. doi: 10.1080/10408398.2022.2153355.

Verteporfin-induced proteotoxicity impairs cell homeostasis and survival in neuroblastoma subtypes independent of YAP/TAZ expression.
Condurat AL, Aminzadeh-Gohari S, Malnar M, Schider N, Opitz L, Thomas R, Menon V, Kofler B, Pruszek J., Sci Rep. 2023;13(1):3760. doi: 10.1038/s41598-023-29796-2.

A Comparison of the Impact of Restrictive Diets on the Gastrointestinal Tract of Mice.
Gregor A, Huber L, Auernigg-Haselmaier S, Sternberg F, Billerhart M, Dunkel A, Somoza V, Ogris M, Kofler B, Longo VD, König J, Duszka K. Nutrients. 2022 Jul 29;14(15):3120. doi: 10.3390/nu14153120.

Ketogenic diets slow melanoma growth in vivo regardless of tumor genetics and metabolic plasticity. Weber DD, Aminzadeh-Gohari S, Thapa M, Redtenbacher AS, Catalano L, Capelôa T, Vazeille T, Emberger M, Felder TK, Feichtinger RG, Koelblinger P, Dallmann G, Sonveaux P, Lang R, Kofler B. Cancer Metab. 2022 Jul 18;10(1):12. doi: 10.1186/s40170-022-00288-7.

Buchbeitrag

Ketogene Ernährungstherapien bei Kindern und Jugendlichen, Kapitel Onkologie, Weber D, Kofler B, Springer submitted

Preise 2022

- International Society for Cancer Metabolism 2022 Travel award: Luca Catalano
- International Society for Cancer Metabolism 2022 Travel award: Julia Tevini
- Österreichische Gesellschaft für Kinder- und Jugendheilkunde: 2022 Best Abstract: Luca Catalano
-