

Aus dem Department für biomedizinische Wissenschaften
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Medizinische Biochemie
(Leitung: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Florian Grebien)

**Untersuchung der Hämoxygenaseaktivität in Geweben
ketogen ernährter Mäuse mit experimentell implantierten
Tumoren nach Chemotherapie**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Tiffany Wurm, BA

Wien, im Oktober 2021

Betreuerin:

Dipl.-Biol. Dr. rer. nat. J. Catharina Duvigneau

1. Gutachterin:

Dipl.-Biol. Dr. rer. nat. J. Catharina Duvigneau

2. Gutachter:

Dr. rer. nat. Felix Locker

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die ketogene Diät	1
1.2	Tumorstadium und ketogene Diät	1
1.3	Die Hämoxigenase	2
1.4	Die zwei Isoformen HO-1 und HO-2	2
1.5	Tumorstadium und Hämoxigenase	3
1.6	Bestimmung der Aktivität	4
1.7	Fragestellung	6
2	Hypothese und Ziele	7
3	Material und Methoden	8
3.1	Verwendete Tiere	8
3.2	Probenaufarbeitung	9
3.3	Homogenisierung der Gewebeprouben	10
3.4	Hämoxigenase-Assay	10
3.4.1	Vorbereitung des HO-Assays	11
3.4.2	Pipettierschema des finalen HO-Assays	12
3.4.3	Extraktion von Bilirubin	14
3.5	Messung am Photometer	15
3.6	BR Konzentrationsbestimmung	17
3.6.1	Erstellen der Verdünnungsstufen	17
3.6.2	Kalibrationsgerade	20
3.7	Proteinbestimmung	21
3.8	Vorversuche	24
3.8.1	Optimierung der BR-Ausbeute im Zuge der HO-Aktivitätsbestimmung	24
3.8.2	Pipettierschema des HO-Assays mit diversen Zusätzen	24
3.9	Datenauswertung und Statistik	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Ergebnis der Optimierung der BR-Ausbeute im Zuge der HO-Aktivitätsbestimmung	28
4.2	Messung der HO-Aktivität in den Gewebeprouben	29

5	Diskussion	33
5.1	Optimierung des HO-Assays.....	33
5.2	Ketogene Gruppe vs. Kontrollgruppe.....	33
6	Conclusio	36
7	Zusammenfassung	37
8	Summary	39
9	Literaturverzeichnis.....	40
10	Abbildungsverzeichnis.....	45

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BSA	Bovines Serumalbumin
BR	Bilirubin
BV	Biliverdin
C ₆ H ₆	Benzol
CO	Kohlenmonoxid
DL	Detektionslimit
DFO	Deferoxamin
Diff OD	Differentielle optische Dichte (OD 450 nm – OD 520 nm)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HO	Hämoxygenase
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NO	Stickoxid
Nrf2	Nuclear factor E2 related factor-2
OD	Optische Dichte, Extinktion
OXTC1	3-Oxosäure CoA-Transferase 1
PP	Polypropylen
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
Tab.	Tabelle
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Die ketogene Diät

In wissenschaftlichen Studien der letzten zwei Jahrzehnte wurde mehrfach bewiesen, dass die Ernährung einen Einfluss auf das Tumorwachstum nehmen kann. In diesem Zusammenhang fällt immer wieder der Begriff ketogene Diät. Diese Form der Ernährung ist eine sehr fettreiche, aber kohlenhydratarme Diät bei ausreichender Aufnahme an Proteinen. Durch den Mangel an Kohlenhydraten kann der Körper bald keine glukosebasierte Energieversorgung aufrechterhalten. Sobald die Glykogenreserven der Gewebe aufgebraucht sind, stellt der Körper auf Hungerstoffwechsel um. Dabei werden Fettsäuren, die bei ketogener Diät reichlich aufgenommen werden, in der Leber zu Ketonkörpern abgebaut. Diese Ketonkörper können alternativ als Energielieferant genutzt werden, auch vom Gehirn. Der beschriebene Stoffwechselzustand nennt sich Ketose.

1.2 Tumorwachstum und ketogene Diät

Nicht alle Tumorzellen können Ketonkörper als Energielieferanten nutzen. Viele sind auf Glukose angewiesen. Man kann nicht generell behaupten, dass sich ein Tumor durch eine ketogene Diät einfach aushungern lässt. Es gibt Tumore, die ihren Stoffwechsel sehr schnell umprogrammieren können, indem sie ein Enzym produzieren (3-Oxosäure CoA-Transferase 1; OXTC1), welches den Abbau und schließlich die Verwertung von Ketonkörpern möglich macht (Zhang und Xie 2017).

Fakt ist, dass eine ketogene Diät in Verbindung mit Chemotherapie das Tumorwachstum von Neuroblastomen verlangsamen und sogar hemmen kann. Bewiesen wurde das in einem Tierversuch von Aminzadeh-Gohari et al. (2017). Der genaue Mechanismus beschäftigt viele Wissenschaftler. Bei Recherchen zu Publikationen im Zusammenhang mit Tumorwachstum und ketogener Diät, taucht immer wieder ein Enzym auf - die Hämoxigenase (HO). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression dieses Proteins durch eine Scheinfastenkur moduliert werden kann, wie ein Versuch von Di Biase et al. (2016) zeigt. Die Fastenkur reguliert die mRNA- und die Proteinspiegel der HO-1 im Tumorgewebe herunter und in gesundem Gewebe hinauf. Krebszellen wurden so sensitiver auf Chemotherapeutika, während normale Zellen gleichzeitig vor den Nebenwirkungen geschützt wurden.

1.3 Die Hämoxygenase

Per Definition ist die HO ein Enzym (EC 1.14.99.3), das Häm mithilfe von NADPH und O_2 zu Eisen (Fe^{3+}), Biliverdin und Kohlenmonoxid oxidativ abbaut (Fiedler 2019). Biliverdin (BV) wird in einem weiteren Schritt durch die Biliverdinreduktase sofort zu Bilirubin (BR) umgewandelt. Katalytisch aktiv sind die Isoformen HO-1 und HO-2. Abbildung 1 veranschaulicht die Degradation des Häms.

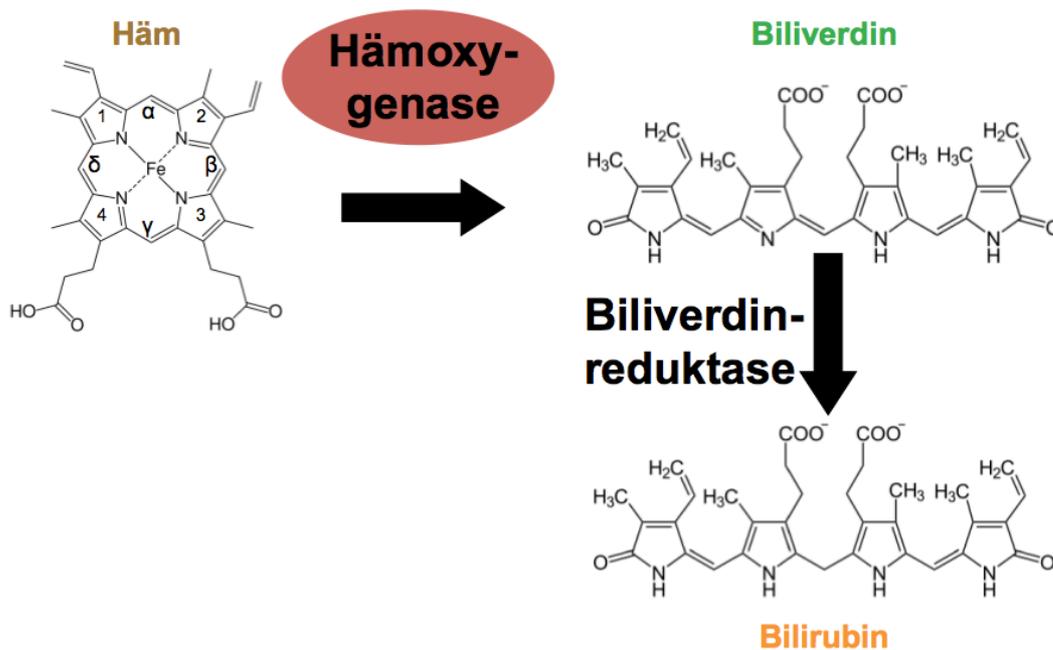


Abb. 1: Unter Mitwirkung der Hämoxygenase (HO) und Biliverdinreduktase (BVR) wird Häm zu Bilirubin (BR) degradiert (Eigene Darstellung).

1.4 Die zwei Isoformen HO-1 und HO-2

Die HO existiert bei den verschiedenen Spezies in mehreren Isoformen und kommt in allen Zellen des Körpers vor. Nur die Isoformen HO-1 und HO-2 sind katalytisch aktiv. HO-1 wird durch viele Faktoren, besonders durch das Substrat Häm, aber auch durch verschiedene Stresssituationen induziert, während die HO-2 nicht stressabhängig, sondern konstitutiv exprimiert wird. Letztere ist unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich hauptsächlich für die Zellhomöostase verantwortlich (Maines und Panahian 2001).

Bei oxidativem Stress, inflammatorischen Prozessen und Hypoxie, also Konditionen, die sehr häufig bei Tumorentstehung gegeben sind, wird vermehrt HO-1 exprimiert. Man geht davon

aus, dass die von der HO gebildeten Abbauprodukte Kohlenmonoxid (CO) und BR antioxidativ, antiinflammatorisch und antiproliferativ wirken (Ferrándiz und Devesa 2008).

Die wichtige Rolle der HO-1 wurde in Studien, bei denen HO-Inhibitoren eingesetzt wurden, oder bei denen die HO-1 durch Silencing ausgeschaltet wurde, gezeigt. Die HO-1 wird hauptsächlich über Transkriptionsfaktoren aber auch über posttranslationale Mechanismen reguliert. Im HO-1 Gen gibt es Enhancer Regionen, die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1-alpha (HIF1 α) oder den Kernfaktor Erythroid 2 verwandter Faktor 2 (Nrf2) enthalten, die die Anlagerung des Transkriptionskomplexes an den Promotor verstärken. Dadurch wird die Transkriptionsaktivität des Gens gesteigert und das Zielgen HO-1 vermehrt exprimiert (Zhang et al. 2020).

Aufgrund der zytoprotektiven Eigenschaften der HO-1, steht sie im Mittelpunkt vieler Forschungen. Die Abbauprodukte der HO, vor allem CO, stimulieren die Gefäßeinsprossung und vermitteln zellprotektive Eigenschaften, welche gute Lebensbedingungen für Tumore schaffen.

1.5 Tumorwachstum und Hämooxygenase

Überall, wo die HO arbeitet, entsteht CO. Dies ist ein Signalmolekül und induziert die Bildung von VEGF, dem Vaskularisierungsfaktor der Angiogenese. Gefäße sprossen ein und sauerstoffreiches Blut kann nun zur hypoxischen Stelle vordringen (Dulak et al. 2008). Ebenfalls ein Abbauprodukt der HO ist das BV und das sofort darin umgesetzte BR. BR hat zellschützende, antioxidative Wirkung (Maruhashi et al. 2019). Obwohl BR in höheren Konzentrationen neurotoxisch wirkt, wurden auch neuroprotektive Effekte festgestellt (Mancuso 2017). Daher könnte man vermuten, dass eine daraus entstehende hohe HO-Aktivität zum Vorteil für Tumore ist.

Tatsächlich konnte bei einer Vielzahl von Tumoren eine erhöhte HO-1 Expression mit einem verbesserten Wachstum, einem erhöhten Schutz vor oxidativem Stress, Apoptose und der Immunabwehr nachgewiesen werden (Loboda et al. 2015). Ein Silencing der HO-1 kann zu einer Sensibilisierung des Tumors gegenüber krebstherapeutischen Methoden führen (Kharb et al. 2020).

Es ist unklar, ob die HO-Aktivität im Gewebe durch eine ketogene Diät modifiziert wird. Eine Studie von Kang et al. (2015) beweist in-vitro eine Abhängigkeit der HO-1 Expression von Glukosespiegeln. Hohe Glukosespiegel führten zu einer erhöhten HO-1 und zu einer erhöhten HO-Aktivität.

Ein veränderter Glukosestoffwechsel wird bei den meisten Tumorarten beobachtet. Viele Tumorzellen gewinnen ihre Energie durch anaerobe Glykolyse, auch wenn genug Sauerstoff vorhanden ist. Dieses Phänomen ist als Warburg-Effekt bekannt (Liberti und Locasale 2016). Diese ineffektive Nutzung der Glukose führt dazu, dass sie besonders viel davon brauchen. Allerdings konnte beobachtet werden, dass Ketonkörper für einige Tumorzellen einen geeigneten Ersatz darstellen.

Im Mausmodell von Aminzadeh-Gohari et al. (2017), einem experimentellen Tumormodell, konnte gezeigt werden, dass die implantierten Neuroblastomzellen bei ketogener Diät besser auf eine Chemotherapie angesprochen haben. Die ketogene Diät könnte zu einer Hemmung der HO-Aktivität und zur Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber der Chemotherapie geführt haben.

Um zu untersuchen, ob es tatsächlich zu einer vermehrten Bildung von HO-Produkten bei Tumorzellen kommt, ist es notwendig nicht nur die Expression der HO-Isoformen, sondern auch ihre Aktivität zu bestimmen.

1.6 Bestimmung der Aktivität

Da beide Isoformen der HO zur HO-Aktivität beisteuern, und Isoform-spezifische Hemmer bis heute nicht erhältlich sind, kann nur die kumulative HO-Aktivität bestimmt werden. Rückschlüsse auf die Aktivität einer einzelnen Isoform sind somit nur in weitergehenden Analysen möglich. Darum wird im Nachfolgenden der Richtigkeit halber nur noch von HO-Aktivität gesprochen.

Einer der ersten in-vitro Assays zur Bestimmung der HO-Aktivität wurde von Tenhunen et al. (1968) beschrieben. Dabei passiert die Bestimmung der HO-Aktivität über das Endprodukt der Reaktion – BR. Tenhunen et al. (1968) erkannten bereits in den sechziger Jahren, dass alles Häm quantitativ in BR über ein gekoppeltes enzymatisches System umgewandelt wird (Abb. 2). Sie bewiesen die Existenz dieses Systems über einen biochemischen Assay, bei

dem das gebildete Endprodukt der Reaktion, als BR identifiziert wurde, welches photometrisch gemessen werden kann und bei 450 nm Wellenlänge sein Absorptionsmaximum hat. Sie verwendeten homogenisiertes Lebergewebe und bestimmten die HO-Aktivität in unterschiedlichen Gewebe-Fractionen. Den Fractionen boten sie in vitro neben dem Substrat Häm auch den Elektronendonator NADPH an. Ihre Arbeiten zeigten, dass die mikrosomale Fraction (also hauptsächlich das endoplasmatische Retikulum) die höchste HO-Aktivität aufweist. Die Aktivität der HO ist auch proportional zur Menge an eingesetztem Protein. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurde im Anschluss auf die Menge an Protein bezogen, das heißt proteinnormalisiert. Je mehr BR pro mg Protein gebildet wurde, desto höher ist die HO-Aktivität. Ihre Erkenntnisse bilden die Grundlage des Assays zur Aktivitätsbestimmung, nach dessen Prinzip auch ich die HO-Aktivität bestimmt habe.

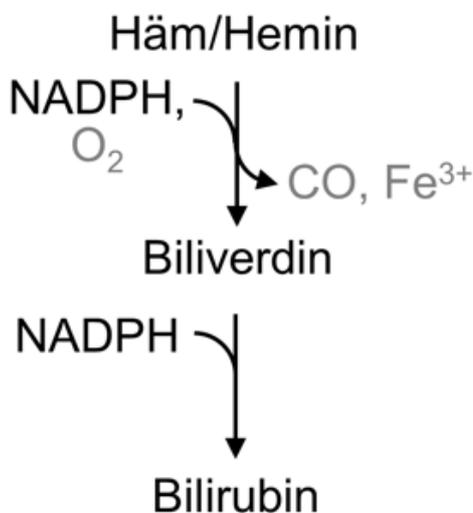


Abb. 2: Aufklärung des Enzymsystems zum Hämabbau in der Leber durch Tenhunen (1968)

Durch Verwendung der dargestellten Substrate (schwarz) konnte nachgewiesen werden, dass Häm in zwei Schritten zu Bilirubin abgebaut wird. Der erste geschwindigkeitsbestimmende Schritt läuft in der mikrosomalen Fraction ab. Er benötigt Sauerstoff und NADPH. In diesem Schritt werden CO und Eisenionen oxidativ freigesetzt. Diese Produkte wurden nicht direkt nachgewiesen (grau). Im zweiten Schritt wird das entstandene Biliverdin durch das zytosolische Enzym Biliverdinreduktase in Bilirubin umgewandelt (Eigene Darstellung).

Um keine Enzymaktivität zu verlieren, wurde bei dem von mir verwendeten Assay das Gewebehomogenat nicht vorab fraktioniert. Anstelle dessen wurde im Anschluss an die Reaktion das gebildete BR in das Lösungsmittel Benzol extrahiert (siehe Abb. 5). Um die geringen Mengen BR, die in der Reaktion gebildet werden, sicher nachweisen zu können, sollte sowohl die Reaktion, als auch die Extraktion möglichst effizient ablaufen.

In den Vorversuchen verfolgten wir das Ziel, durch verschiedene Zusätze vor der Extraktion die Ausbeute an BR im HO-Assay zu erhöhen. Dabei wurden zwei Herangehensweisen

ausgetestet. Einerseits sollte durch Zugabe eines Reduktionsmittels oder eines Eisenchelators zur Reaktion getestet werden, ob sich die Effizienz des biochemischen Umsatzes steigern lässt. Andererseits wurde untersucht, ob sich durch Zugabe von Coffein im Anschluss an die biochemische Reaktion die Extraktion in die organische Phase verbessern lässt. Ein optimiertes Verfahren würde die sichere Analyse der HO-Aktivität in relativ kleinen Gewebeproben ermöglichen.

Mit dem optimierten Assay sollte dann die HO-Aktivität in Gewebeproben von Mäusen eines experimentellen Tumormodells analysiert werden

1.7 Fragestellung

Aminzadeh-Gohari et al. (2017) konnten zeigen, dass eine ketogene Diät das Tumorstadium hemmen kann. Liegt der Grund dafür in einer verminderten Aktivität der HO? Steht die Hemmung der HO-Aktivität in Zusammenhang mit der ketogenen Ernährung? Wenn ja, sollte die HO-Aktivität in Tumoren bei ketogener Diät signifikant niedriger sein als bei einer Standard-Diät.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die HO-Aktivität in Geweben ketogen und nicht-ketogen ernährter Mäuse mit experimentell transplantierten Tumoren nach Chemotherapie untersucht. Es handelt sich dabei um eine Kooperationsstudie mit der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Salzburg (PMU). An den Tierversuchen war das Institut der Medizinischen Biochemie der Vetmeduni Vienna nicht beteiligt. Die Gewebeproben stammen aus einem experimentellen Mausmodell, welches im Labor von Frau Prof. Barbara Kofler der PMU etabliert ist. Von diesem experimentellen Mausmodell, wurden uns für die Analyse der HO-Aktivität Gewebeproben der Mäuse zur Verfügung gestellt. Untersuchungen zur HO-Aktivität finden in der Forschungsgruppe von J. Catharina Duvigneau (Institut für medizinische Biochemie, VetmedUni Vienna) seit vielen Jahren statt (Duvigneau et al. 2020; Duvigneau et al. 2019; Duvigneau et al. 2017; Müllebner et al. 2018; Müllebner et al. 2015).

2 Hypothese und Ziele

Wir nehmen an, dass die stärkere Wirksamkeit der Chemotherapie auf eine verminderte HO-Aktivität in den Tumorzellen zurückzuführen ist. Dadurch sind die Tumorzellen schlechter gegen den Zellstress der Chemotherapie geschützt und sterben unter der Behandlung schneller ab.

Hypothese: Die ketogene Diät hat wegen einer erniedrigten HO-Aktivität im Tumorgewebe zu einer höheren Effizienz der Chemotherapie geführt.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Tiere

Die folgenden Informationen zu den verwendeten Tieren stammen aus der Publikation von Aminzadeh-Gohari et al. (2017). Aus diesem experimentellen Mausmodell wurden uns für eine Analyse der HO-Aktivität Gewebeproben zur Verfügung gestellt. In der Studie wurde 18 Mäusen Neuroblastome implantiert und die Tiere auf zwei Gruppen aufgeteilt.

Für die Untersuchung der Fragestellung wurden uns eingefrorene Gewebeproben zur Verfügung gestellt. An der Versuchsplanung, der Durchführung der Tierversuche und der Probengewinnung waren wir nicht beteiligt. Um jedoch die erhaltenen Ergebnisse diskutieren zu können, wird hier das zugrundeliegende Tiermodell näher beschrieben, sowie auf die Behandlung der Tiere für diese Versuchsserie genauer eingegangen.

Der Versuch wurde an CD-1 Nude Mäusen (Charles River, Wilmington, MA, USA) durchgeführt (Abb. 3). Diese eignen sich besonders gut für Untersuchungen der Tumorbilogie. Die Tiere bekamen zwischen der 5. und 6. Lebenswoche an der rechten Flanke ein Xenotransplantat von menschlichen Neuroblastomzellen, bestehend aus den Zelllinien SH-SY5Y und SK-N-BE(2). Dabei wurde subkutan eine 200 μ l Mischung der beiden Zelllinien (2×10^7 Zellen pro Maus) injiziert. Die Mäuse wurden pathogenfrei gehalten.



Abb. 3: CD-1 Nude Maus (Charles River 2020)

Als die Tumore eine bestimmte Größe erreicht hatten, erhielt die eine Gruppe weiterhin eine Standard-Diät, welche kohlenhydratreich war. Die andere Gruppe bekam eine ketogene Diät, deren Energiebereitstellung mittels Lipiden erfolgte. Es wurden Lipidquellen verwendet, die besonders reich an mittelkettigen Fettsäuren sind. Auf die genaue Zusammensetzung der Diät und den Vergleich von mittel- und langkettigen Fettsäuren zum Einsatz in einer

ketogenen Diät wird in der Publikation ausführlicher eingegangen. Beide Gruppen wurden nach 14 Tagen mit Chemotherapie behandelt. Am Tag 36 wurden den Mäusen unter Anästhesie Organproben entnommen und die Tiere im Anschluss euthanasiert.

3.2 Probenaufarbeitung

Aliquote der folgenden Gewebe, welche bei -80°C gelagert waren, wurden auf Trockeneis nach Wien transportiert: Hirn, Leber, Niere und Tumor. Diese Proben wurden ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit aufgearbeitet und analysiert (Blindstudie). Die Gruppenzuordnung wurde erst nach Übermittlung der Daten bekanntgegeben (Dekodierung in Tab. 1). Die Tiernummern haben wir bekommen und sie der Einfachheit halber übernommen.

Von Hirn und Leber wurden 18 Proben aufgearbeitet. Bei Niere waren es 16 und bei Tumorgewebe 15 Proben. Beim Tumor fehlten drei Proben, da von diesem kein Material mehr vorhanden war. Ein auffälliges Erscheinungsbild der Homogenate wurde vermerkt (z. B. hämorrhagisch; in Tabelle 1 rot markiert.) Das Gewicht wurde in Milligramm angegeben. Daten der hämorrhagischen Homogenate wurden nicht aus der Statistik ausgeschlossen, da die HO-Aktivität bei den hämorrhagischen Proben ähnlich wie die der Vergleichsproben war und dies die Anzahl der Proben zu stark verringert hätte.

Tabelle 1: Gewicht der Gewebeproben je Gewebeart und Tier

	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Hirn	242	108	225	183	229	132	253	207	255	181	201	235	184	205	212	237	240	181
Leber	103	222	90	163	177	253	209	181	133	100	136	158	116	187	147	127	177	110
Tumor	79	161	294	215	223	178	180	110	76	191	123	----	57	108	152	----	86	----
Niere	----	187	157	169	163	----	219	214	223	100	163	142	121	146	143	159	165	138

Bevor die Proben aus Salzburg aufbereitet werden konnten, wurden das Verfahren der Homogenisierung und die Bestimmung der HO-Aktivität geübt. Dazu wurden mir Reste von Gewebeproben (z.B. Milz-, Hirn- und Lebergewebe) von Kontrollmäusen oder Kontrollratten zur Verfügung gestellt, die aus anderen Versuchen übrig geblieben waren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert wurden. Jene Homogenate dienten außerdem der Optimierung des HO-Assays wie in Kapitel 3.8 beschrieben.

3.3 Homogenisierung der Gewebeprobe

Die Gewebestückchen wurden in gefrorenem Zustand im Verhältnis 1:10 (w:v) mit einem Homogenisator (Elvehjem-Potter mit Teflon-Pestill) in einem Puffer (300 mM Saccharose, 20 mM Tris, und 2 mM EDTA; pH 7,4) auf Eis homogenisiert (Abb. 4). Von jeder Probe fertigten wir 2 x 170 µl Aliquote an. Der Rest wurde mit den Überständen derselben Gewebeart gepoolt. Die so angefertigten Duplikate und der Pool standen immer auf Eis. Danach wurden die Homogenate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Bearbeitung bei -80°C aufbewahrt.

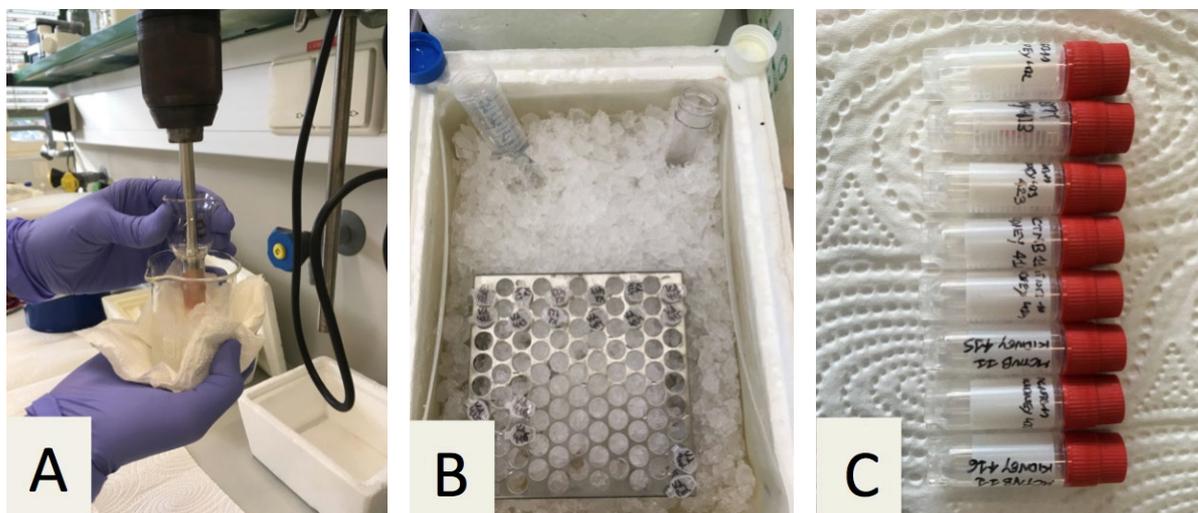


Abb. 4: Schritte der Gewebhomogenisierung, (A) Homogenisierung der Proben mit dem Elvehjem-Potter auf Eis, (B) Homogenate in 2 x 170 µl Aliquoten auf Eis um eine enzymatische Aktivität zu verhindern, (C) Die Probengefäße der Niere. Die Gefäße wurden nach Entnahme der Proben ab fotografiert um die Reihenfolge zu dokumentieren (Eigene Darstellungen).

3.4 Hämoxygenase-Assay

Bevor die Proben im HO-Assay aufgearbeitet wurden, wurde der Assay optimiert. In diesen Vorversuchen ging es darum, mit den zugesetzten Reagenzien die bestmögliche Produktausbeute zu erreichen. Für die Erhöhung der Produktbildung im Assay wurden folgende Zusätze getestet: Der Zusatz eines Eisenchelators (Deferoxamin, DFO) und der Zusatz eines Reduktionsmittels (Dithiothreitol, DTT). Um die Extraktion des BR zu verbessern, wurde Coffein eingesetzt. Auf diesen Vorversuch möchte ich im letzten Kapitel von Material und Methoden näher eingehen (Durchführung siehe Kapitel 3.8; Ergebnisse siehe Kapitel 4.1).

Alle Reagenzien, die für den HO-Assay und seine Vorversuche zum Einsatz kamen, sind in Tabelle 2 aufgezählt. Die Konzentrationen beziehen sich auf die verwendeten Stammlösungen.

Tabelle 2: Reagenzien des HO-Assays und der Vorversuche

Lösungen für den HO-Assay	Konzentrationen der Stammlösungen
HO-Assay-Puffer	100 mM Kaliumphosphat; 1 mM EDTA; pH 7,4
Deferoxamin (DFO)	100 mM
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Rein (als Lösungsmittelkontrolle)
Hämin	1 mM und 10 mM in DMSO
NADPH	10 mM in HO-Assay-Puffer
Coffeinlösung	Coffein (0,25 M); Natriumbenzoat (0,52 M); Natriumacetat (0,9 M; in HO-Assay-Puffer)
Kaliumchlorid (KCl)	Gesättigte Lösung
Benzol (C ₆ H ₆)	Rein
Dithiothreitol (DTT)	20 mM

3.4.1 Vorbereitung des HO-Assays

Der HO-Assay-Puffer und die Coffein-Lösung wurden als erstes aus dem -20°C Gefrierfach genommen und ungefähr eine halbe Stunde im warmen Wasserbad aufgetaut. Assay-Puffer und Coffein-Lösung wurden nach dem Auftauen wieder auf Eis gestellt. Die Homogenate wurden 30 Sekunden im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und nach dem Vortexen sofort auf Eis gestellt. Da Hämin lichtempfindlich ist, wurde es im Dunklen aufgetaut. Wegen des höheren Schmelzpunktes von DMSO (Schmelzpunkt 19°C), wurden alle DMSO-Lösungen nach dem Auftauen nicht auf Eis gestellt, da sie sonst sofort wieder einfrieren würden, sondern bei Raumtemperatur bis zum Gebrauch aufbewahrt. Ebenso wurde KCl bei Raumtemperatur bis zur Verwendung aufbewahrt.

Der Ablauf des HO-Assays ist in der Abbildung 5 schematisch dargestellt.

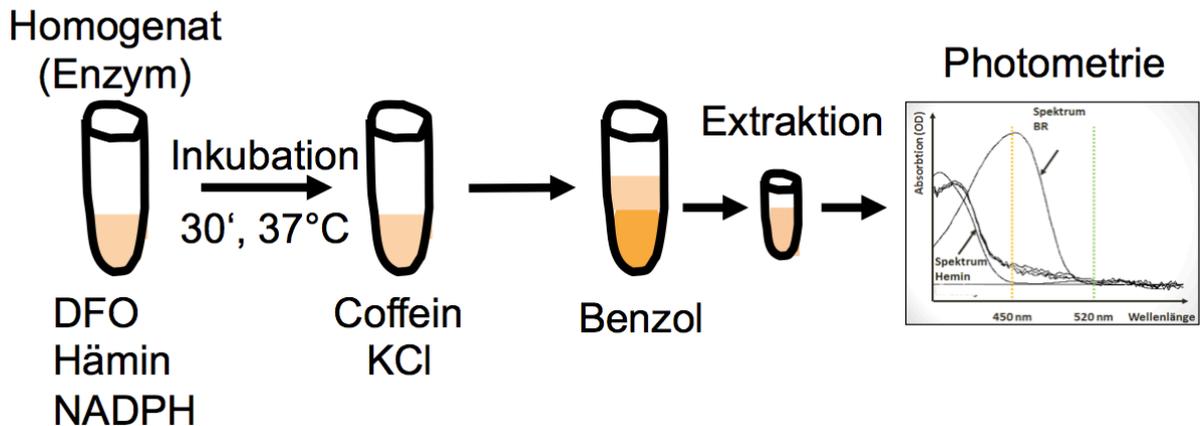


Abb. 5: Arbeitsschritte im Hämoxygenase-Assay

Zum Homogenat wurden Puffer, Deferoxamin (DFO), Hämin und NADPH hinzugefügt. Nach einer 30' (30-minütigen) Inkubation bei 37°C wurden Coffein-Lösung und Kaliumchlorid (KCl) dazu pipettiert. Abschließend wurde 1 ml Benzol hinzugefügt und (nach einem bestimmten Vortexschema) die obere organische Phase geerntet, in der sich nun das entstandene BR gelöst hatte. Grafik der Photometrie wird an anderer Stelle erklärt, siehe Abb. 9 (Eigene Darstellung).

Je Homogenat wurden Duplikate und eine Negativkontrolle in Polypropylen-Röhrchen (PP-Röhrchen) auf Eis angesetzt. Zunächst wurde HO-Assay-Puffer in die eisgekühlten Röhrchen vorgelegt (Abb. 6A). Dazu wurden Homogenat, Hämin (1 mM) und NADPH (10 mM) pipettiert.

Bei den Negativkontrollen wurde kein Hämin und kein NADPH hinzugefügt weil hier kein BR gebildet werden sollte. Um überall das gleiche Endvolumen zu erhalten, ersetzten wir das fehlende Hämin mit DMSO, dem Lösungsmittel des Hämins, und das NADPH mit HO-Assay-Puffer.

3.4.2 Pipettierschema des finalen HO-Assays

Wie hier in Tabelle 3 beschrieben, wurde der finale Assay bei den zu analysierenden Homogenaten aus Salzburg angewendet.

Tabelle 3: Pipettierschema des finalen HO-Assays¹

Nr.	Name	Assay Buffer [μ l]	Homogenat [μ l]	DFO 100 mM [μ l]	DMSO [μ l]	Hämin 1 mM [μ l]	NADPH 10 mM [μ l]	Inkub. [37°C]
#1	Unikat	67	50	8	----	4	25	Für 30 Min.
#2	Duplikat	67	50	8	----	4	25	
#3	Negativkontrolle	92	50	8	4	----	----	

Nr.	Coffein 0,25 M [μ l]	KCl gesättigt [μ l]	Endvol [μ l]	C ₆ H ₆ [μ l]
#1	50	50	254	1000
#2	50	50	254	1000
#3	50	50	254	1000

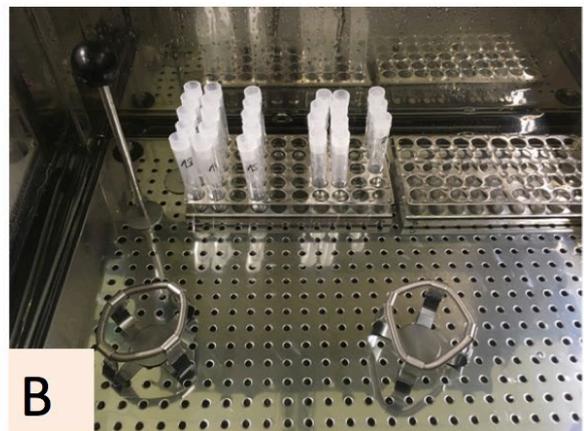
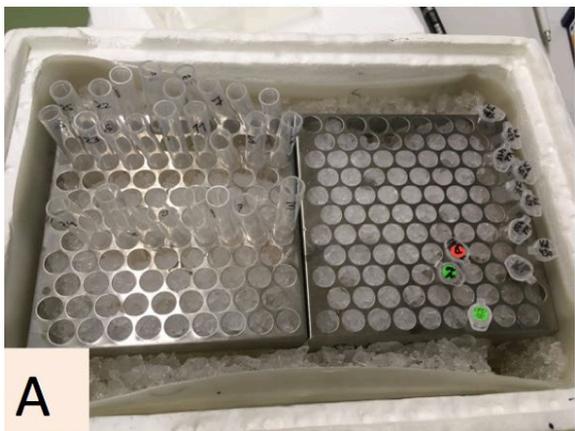


Abb. 6: PP-Röhrchen auf Eis und im Schüttelinkubator, (A) PP-Röhrchen (links) und Proben (ganz rechts) auf Eis, (B) Blick in den Schüttelinkubator. Die PP-Röhrchen stehen im 37°C warmen Wasser und werden in kreisförmigen Bewegungen geschüttelt (Eigene Darstellungen).

Sobald der Puffer, das Homogenat, die optionalen Zusätze DTT oder DFO, Hämin, NADPH und DMSO den PP-Röhrchen zugesetzt wurden, wurden diese nach dem Vortexen verschlossen und ins 37°C warme Schüttelwasserbad (GFL 1092) gestellt. Die Inkubation fand bei 37°C für 30 Minuten bei 200 kreisförmigen Schüttelhüben pro Minute statt (Abb. 6B),

¹Das Endvolumen der wässrigen Komponenten sollte standardmäßig 250 μ l ausmachen. Porphyrine wurden stets in einem fixen Volumen von 4 μ l zugesetzt. Daher ist das Gesamtvolumen zuzüglich DMSO/Hämin 254 μ l.

um die HO-Reaktion ablaufen und BR unter kontrollierten Bedingungen entstehen zu lassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Röhren sofort wieder auf Eis gestellt.

3.4.3 Extraktion von Bilirubin

Im nächsten Schritt wurde in alle Reaktionsgefäße Coffein-Lösung pipettiert. Danach wurden alle Röhren gevortext und fünf Minuten stehen gelassen, um das BR von den Proteinen zu verdrängen. Da das zur Extraktion des BR zugesetzte Benzol eine Emulsion mit den Proteinen des Homogenats bilden könnte, welche die photometrische Messung beeinträchtigt, wurde gesättigte KCl-Lösung dazu pipettiert, um die wässrige Phase zu polarisieren. Wieder wurden alle Gefäße gevortext. 1 ml Benzol wurde unter dem Abzug in alle PP-Röhren pipettiert und die Röhren wurden verschlossen. Damit das BR vollständig in das organische Lösungsmittel extrahiert werden kann, wurde nach einem standardisierten Schema sehr gründlich gevortext (maximale Einstellung): 3x lang (4s), Phasentrennung abwarten, 3x kurz (1s), Phasentrennung abwarten, 3x lang (4s), Phasentrennung abwarten. Alle PP-Röhren wurden danach 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer Zentrifuge mit Ausschwingmotor (Sorvall RC 3C Plus) bei 1250 rpm (400 g) zentrifugiert.

Im letzten Schritt wurde die obere organische Phase vorsichtig mit einer Kolbenhubpipette aufgesogen, ohne Material aus der Interphase (denaturierte Proteine) oder Teile der darunter befindlichen wässrigen Phase mitzunehmen (Abb. 7). Um ausreichend Extrakt für die Photometrie zu gewinnen, wurden mindestens 700 µl geerntet. Die Lösung wurde in beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Diese mussten mindestens 10 Minuten stehen gelassen oder bei -20°C eingefroren werden, um die möglicherweise vorhandenen winzigen wässrigen Bestandteile abzutrennen, bevor eine Messung am Photometer erfolgen durfte. An dieser Stelle konnte der Arbeitsablauf unterbrochen werden.

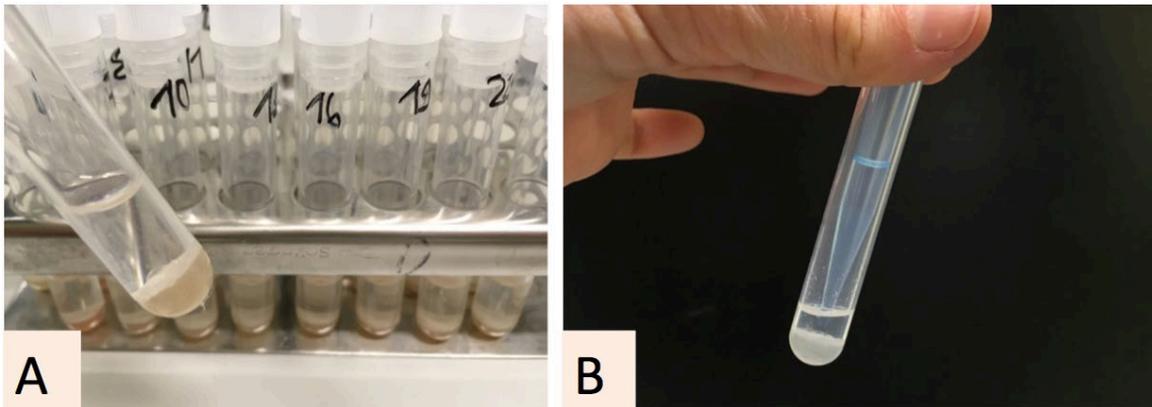


Abb. 7: Phasentrennung und Ernte der organischen, Bilirubin-hältigen Phase, (A) deutliche Phasentrennung nach Zugabe von Benzol, (B) Ernten der oberen organischen Phase mit Hilfe einer Pipette (Eigene Darstellungen).

3.5 Messung am Photometer

Zur Quantifizierung der BR-Menge in den Proben wurde eine photometrische Messung herangezogen. BR weist in organischen Lösungsmitteln ein Absorptionsmaximum bei 450 nm Wellenlänge auf. Die Messung der Extinktion (OD) erfolgte an einem Zweistrahlphotometer (Hitachi U3000/U3900 Photometer). Verwendet wurden Halbmikroküvetten (High Precision Cell, Suprasil mit 10 mm Schichtdicke; Hellma Analytics, Müllheim, Germany). Das Zweistrahlphotometer (Abb. 8A) misst zwei Küvetten (Abb. 8B) gleichzeitig. Die hintere Küvette wurde mit 1ml Benzol, zur Referenz, befüllt. Sie blieb während der gesamten Messperiode im Gerät (Abb. 8C). Die vordere Küvette wurde für die Extrakte verwendet. Das Zweistrahlphotometer wurde so eingestellt, dass im Wellenlängenbereich von 400 bis 600 nm Scans (Abb. 8D) aufgenommen werden (Scanspeed 120 nm/min; Schlitzbreite 5 nm; Intervallstep 2 nm; Photomultiplier auf Auto). Die erste Messung wurde immer mit Benzol als Leerwert durchgeführt, zur Kontrolle des Nullabgleichs (Nulllinie).

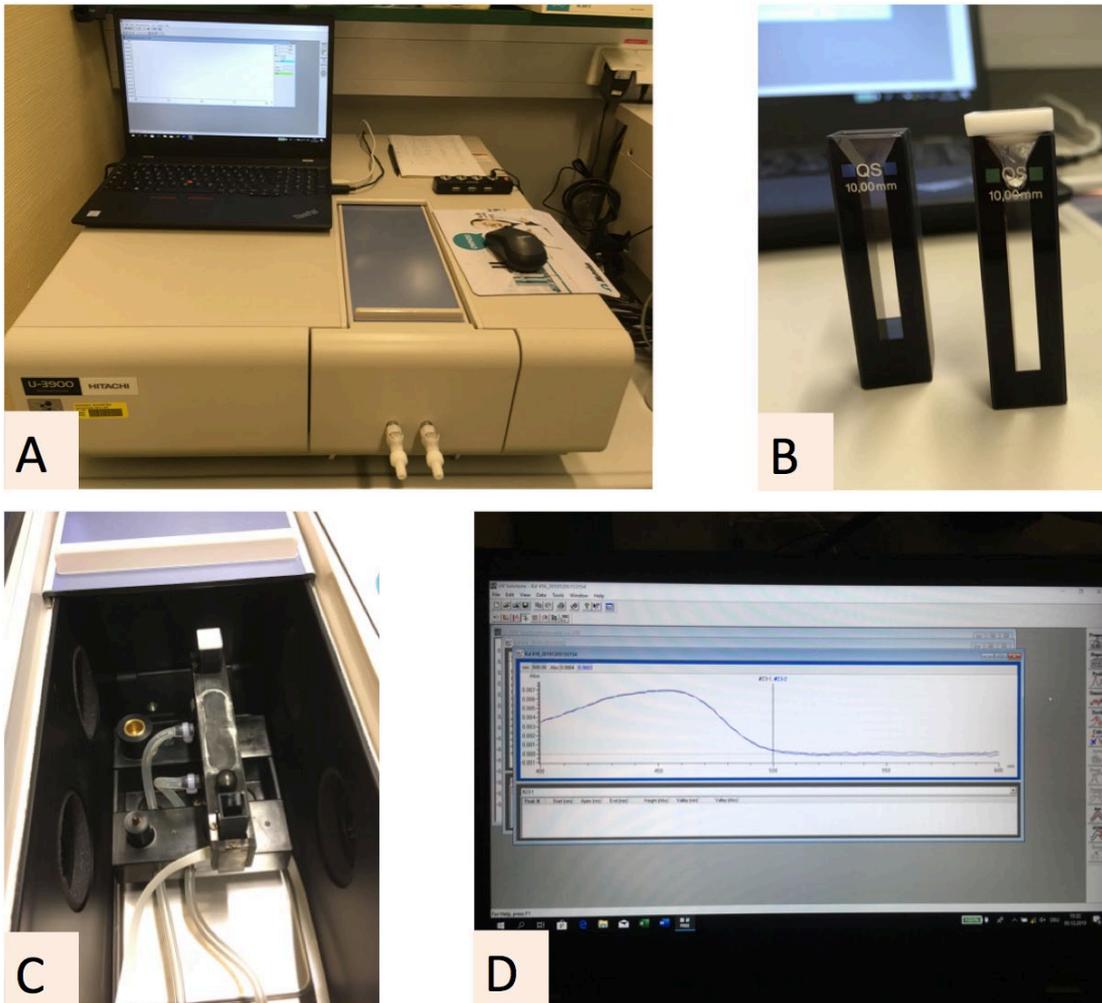


Abb. 8: Die Messung am Zweistrahlphotometer, (A) Zweistrahlphotometer U-3900 von Hitachi, (B) Probenküvette (links) und Referenzküvette (rechts), (C) Blick in den Zweistrahlphotometer. Die hintere Küvette mit dem weißen Deckel ist mit Benzol gefüllt und verbleibt während der gesamten Messung im Photometer, (D) Exemplarisches Beispiel eines gescannten Extrakts. Das Zweistrahlphotometer misst die Absorption als Scans zweimal hintereinander. Beide Scans sind als Überlagerung dargestellt (Eigene Darstellungen).

Benzol ist ein transparentes organisches Lösungsmittel. Bevor die Extrakte gemessen wurden, wurde die Absorption von Benzol (und der Glasküvette) im Wellenlängenbereich von 400 bis 600 nm für den Nullabgleich herangezogen. Diese Werte wurden bei den anschließenden Messungen seitens der Software von der Absorption der Extrakte abgezogen.

Wie in der Abb. 9 zu erkennen ist, absorbiert BR bei 450 nm maximal, während es bei 520 nm keine Eigenextinktion aufweist. Da sich die Spektren von Häm in und BR überlappen, sind je nach Menge an verbliebenem Häm in Kompositionsspektren bei der Vermessung der Proben zu erwarten. Um die BR-spezifische Extinktion zu erhalten, wurde die Differenz der Extinktionen (Diff OD) von 450 nm - 520 nm gebildet.

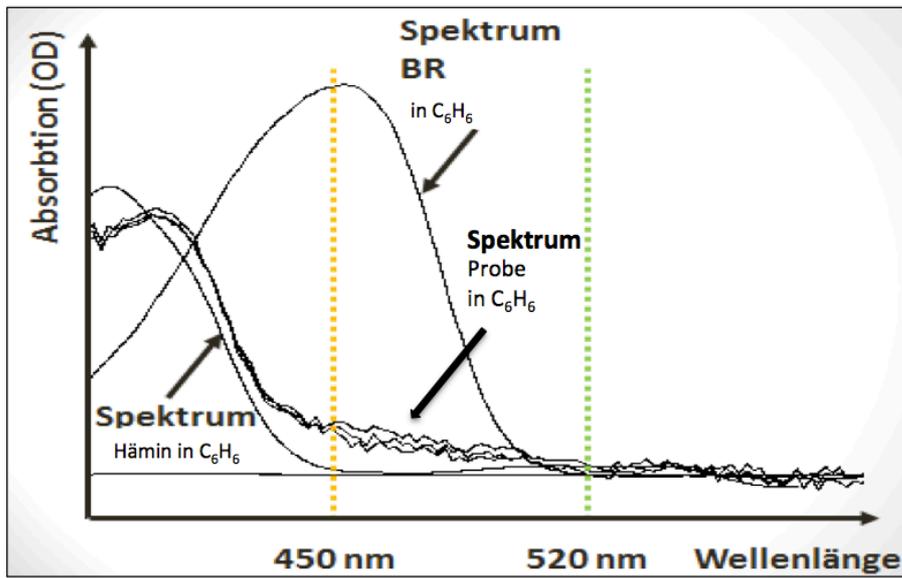


Abb. 9: Absorptionsspektren der Einzelsubstanzen Bilirubin (BR) und Häm in Benzol (C₆H₆) gelöst, sowie eines Benzolextrakts nach Durchführung eines HO-Assays. Es ist zu erkennen, dass sich die Spektren überlappen, sodass residuales Häm in den BR-Extrakten ein Kompositionsspektrum ergibt. Dies ist dargestellt im Kompositionsspektrum einer Probe (im Triplikat), in der viel Häm in und minimale Mengen von gebildetem Bilirubin enthalten sind. Die gestrichelte gelbe Linie zeigt das Absorptionsmaximum von BR (450 nm) und die gestrichelte grüne Linie die Referenzwellenlänge von 520 nm zur Berechnung der BR-spezifischen Extinktion (Eigene Darstellung).

3.6 BR Konzentrationsbestimmung

3.6.1 Erstellen der Verdünnungsstufen

Die Umrechnung der BR-spezifischen OD in nmol BR erfolgte mithilfe einer Kalibrationsgerade. Dafür stellten wir eine 5 mM BR-Stammlösung her, die schrittweise mit DMSO verdünnt wurde. Um eine gleichmäßige Verteilung der Datenpunkte zu erreichen, stellen wir zunächst eine 1:10 (V₀) und eine 1:5 Verdünnung (X₀) her. Beide werden nun schrittweise 1:3,333 verdünnt (Tab. 4).

Tabelle 4: Pipettierschema zur Herstellung der Verdünnungsstufen für die BR-Kalibrationsgerade

Name	Vol DMSO [μ l]	Zusatz	Vol Zusatz [μ l]	Endvol [μ l]	Verdünnung
V0	180	Stock 5mM	20	200	1:10
X0	80	V0	20	100	1:5
V1	70	V0	30	100	1:3,333
X1	70	X0	30	100	1:3,333
V2	70	V1	30	100	1:3,333
X2	70	X1	30	100	1:3,333
V3	70	V2	30	100	1:3,333
X3	70	X2	30	100	1:3,333
V4	70	V3	30	100	1:3,333
X4	70	X3	30	100	1:3,333
V5	70	V4	30	100	1:3,333
X5	70	X4	30	100	1:3,333
V6	70	V5	30	100	1:3,333
X6	70	X5	30	100	1:3,333

Von jeder Verdünnungsstufe wurden in Duplikaten 10 μ l zu 150 μ l Assay Puffer in PP-Röhrchen pipettiert. Um für eine idente Probenzusammensetzung zu sorgen, und damit für idente Bedingungen für die Extraktion von BR, wurden sämtliche Reagenzien, die für den HO-Assay eingesetzt wurden, auch für die Herstellung der Kalibrationsgerade verwendet. Wie beim HO-Assay wurden daher 50 μ l Coffein und 50 μ l KCl dazu pipettiert und nach Hinzufügen der beiden Reagenzien gevortext. Das Vehikel DMSO, welches als Lösungsmittel für Häm oder BR diente, wurde zur Bestimmung des Detektionslimits verwendet. Dafür wurden 4 x 10 μ l DMSO mit 150 μ l Assay Puffer, 50 μ l Coffein und 50 μ l KCl vermengt. Zu allen Verdünnungsstufen kam am Schluss 1ml Benzol dazu (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammensetzung der Proben für die BR-Kalibrationsgerade

Name	Probe [μ l]	Assay Puffer [μ l]	Coffein [μ l]	KCL [μ l]	Benzol [μ l]
V0 bis X6	10	150	50	50	1000
DMSO	10	150	50	50	1000

Analog wie beim HO-Assay wurde nach Vortexen und Zentrifugation die organische Phase vorsichtig abgenommen und die Extinktion der Extrakte am Photometer vermessen, wie in Kapitel 3.5 beschrieben. Benzol allein wird ebenfalls gemessen und diente zur Kontrolle der Nulllinie. Das Detektionslimit wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{OD des Detektionslimits (OD}_{\text{DL}}) = \text{Mittelwert der OD 450 - 520 von DMSO} + (3 * \text{SD})$$

Mit dem so errechneten Wert (0,0007) wurde die BR-Konzentration am DL errechnet, indem die Regressionsparameter der BR-Kalibrationsgerade (siehe Kapitel 3.6.2) herangezogen wurden. Durch Umrechnung über die Geradengleichung wurde eine BR-Konzentration von 28 pmol BR/ml Benzol als DL ermittelt.

In folgender Tabelle (Tab. 6) sind die umgerechneten BR-Konzentrationen den gemessenen mittleren BR-spezifischen Extinktionen der Standards gegenübergestellt. Alle Messungen wurden leerwertbereinigt.

Tabelle 6: Gegenüberstellung Stoffmengenkonzentration und Extinktion²

Name	BR Konzentration in nmol/ml	Mittlere Diff OD	SD
DMSO	0	0,0003625	0,000125
V0	5	0,259	0,00005
V1	1,5	0,07535	0,00005
X0	1	0,050375	0,000175
V2	0,45	0,021	0,00005
X1	0,3	0,013675	0,000075
V3	0,135	0,00525	0,00015
X2	0,09	0,0032	0,00015
V4	0,0405	0,000475	0,000075
X3	0,027	0,00045	0,00005
V5	0,01215	0,000375	0,000075
X4	0,0081	0,000075	0,000025
V6	0,003645	0,00005	0,00005
X5	0,00243	0,00005	0,00005
X6	0,000729	0,0001	0

² Jede Verdünnung und auch das DMSO wurden im Duplikat gemessen und die Werte gemittelt (Mittlere Diff OD). Wie stark sich die Messungen der Duplikate unterscheiden, wird in der Standardabweichung (SD) dargestellt.

3.6.2 Kalibrationsgerade

Nur ODs derjenigen BR-Konzentrationen, die oberhalb vom Detektionslimit lagen, wurden für die Erstellung der Kalibrationsgerade herangezogen. Dazu wurden die ODs (Y-Achse) gemittelt und mit den input-BR-Konzentrationen (X-Achse) in ein Koordinatensystem eingetragen, bei dem beide Achsen doppelt-logarithmisch dargestellt wurden (Abb. 10). Der Zusammenhang von OD und BR-Konzentration ist ab dem Detektionslimit im **gewählten Konzentrationsbereich** linear. Daraus ergab sich die folgende Geradengleichung: $y = 0,0479 * x^{1,093}$.

Sie wurde für die Bestimmung der BR-Konzentrationen der Unbekannten herangezogen. Da die BR Menge, die im HO-Assay produziert wurde, standardmäßig in 1 ml Benzol extrahiert wurde, konnte aus der erhaltenen Konzentration direkt die Menge BR (in nmol) angegeben werden.

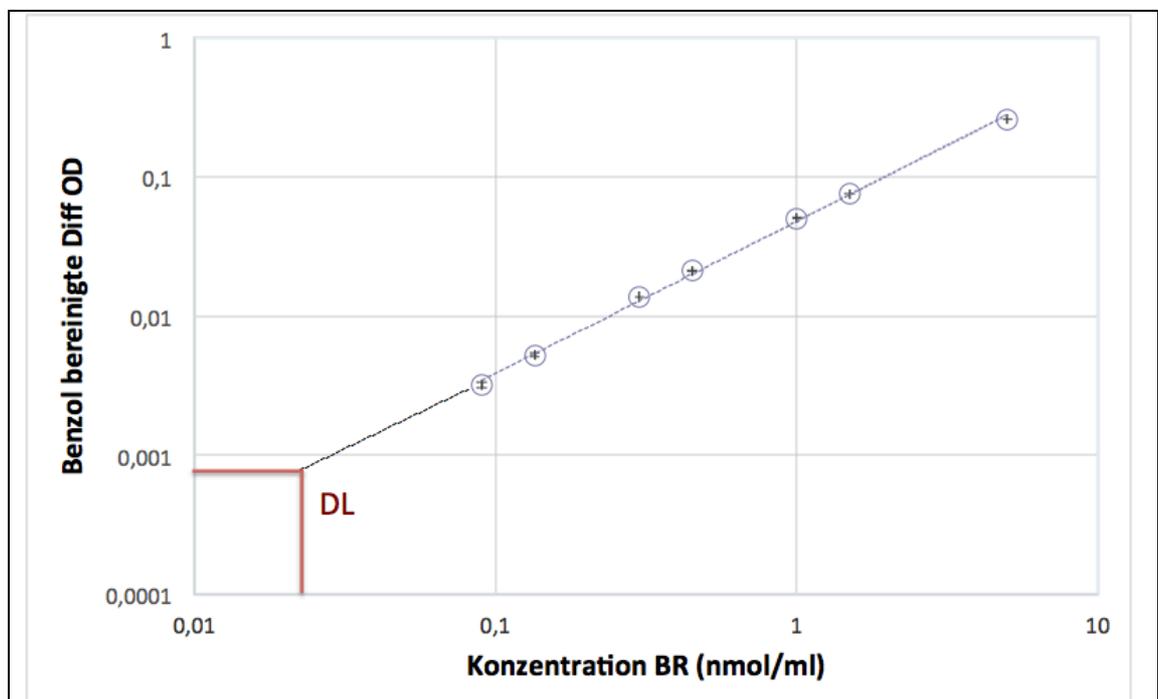


Abb. 10: Kalibrationsgerade von Bilirubin in Benzol. Verwendet wurden BR-Standards zwischen 5 und 0,09 nmol/ml. Dargestellt sind die mittleren Extinktionen (Ods); deren Standardabweichungen (SDs) werden in den offenen Kreisen angezeigt. Die sich ergebende Regressionsgerade (gepunktete Linie) wurde mit Excel (als exponentielle Trendlinie) eingefügt unter Verwendung derjenigen Wertepaare, deren OD größer als das DL (0,0007) war. Dazu gehören die Extinktionen der Verdünnungsstufen V0, V1, V2, V3, X0, X1 und X2. Geradengleichung: $y = 0,0479 * x^{1,093}$. Die rote Markierung stellt das Detektionslimit dar (bei OD = 0,0007 und BR-Konzentration = 0,028 nmol/ml).

3.7 Proteinbestimmung

Zur Normalisierung der im HO-Assay produzierten Bilirubinmengen wurde die Proteinkonzentration der Homogenate herangezogen. So ließ sich eine Aussage darüber treffen, wie viele nmol Bilirubin pro Milligramm Protein gebildet wurden. Die Proteinbestimmung wurde mithilfe eines Bradford-Assays durchgeführt. Bei dieser Methode binden basische Seitenketten der Aminosäuren in Proteinen an einen Triphenylmethan-Farbstoff (Coomassie-Brilliant-Blau), wodurch es zu einer Veränderung des Absorptionsmaximums kommt. Zwischen der Konzentration der Proteine und der Extinktion beim Maximum (596 nm) besteht in dem genannten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe einer Kalibrationsgerade, die aus Bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt wurde (siehe Tab. 7), bestimmt.

Für die Durchführung dieser Methode benötigten wir Eppendorfgefäße, BSA-Stammlösung (1 mg/ml), Coomassie-Blue-Lösung, 0,9%ige NaCl-Lösung (NaCl) und die Homogenate der Proben. Zunächst wurde die BSA-Stammlösung (1 mg/ml) mit NaCl 1:10 verdünnt. Diese Verdünnung wurde Standard 1 genannt. Ausgehend von Standard 1 wurden die anderen Standards seriell bis Standard 5 verdünnt. Vor jedem Pipettieren wurde die hergestellte Ausgangslösung gevortext.

Tabelle 7: Herstellung der BSA Standards

Name	Verdünnungsschritte	Konzentration Protein [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
Standard 1	450 μl 0,9% NaCl + 50 μl BSA (1mg/ml)	100
Standard 2	50 μl 0,9% NaCl + 150 μl S1	75
Standard 3	100 μl 0,9% NaCl + 100 μl S1	50
Standard 4	150 μl 0,9% NaCl + 50 μl S1	25
Standard 5	190 μl 0,9% NaCl + 10 μl S1	5

Der Messbereich des Bradford-Assays liegt zwischen 5 - 100 μg Protein/ml. Damit die Proteinkonzentrationen der Unbekannten in diesen Bereich fallen, wurden von allen Homogenaten zwei Verdünnungsstufen (1:100 und 1:200 in NaCl) in mehreren Schritten hergestellt (Tabellen 8 und 9) und für die Messung herangezogen.

Die BSA-Verdünnungen und natürlich die zu messenden Homogenate standen permanent auf Eis.

Tabelle 8: Verdünnungsschritte der Homogenate 1:100

Zielverdünnung	Verdünnung A	Verdünnung B
1:100	1:20 95 µl 0,9% NaCl + 5 µl Probe	1:5 200 µl 0,9% NaCl + 50 µl Verdünnung A

Tabelle 9: Verdünnungsschritte der Homogenate 1:200

Zielverdünnung	Verdünnung C
1:200	1:2 100 µl NaCl + 100 µl Verdünnung B

Anschließend wurden je 50 µl der 0,9% NaCl-Lösung (Leerwerte), der Proben und Standards in Duplikaten auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Leerwerte und Standards wurden in vordefinierte Näpfe pipettiert, um die anschließende automatisierte Auswertung zu gewährleisten.

Tabelle 10: Pipettierschema des Bradford Assays

		Spaltennummern auf Mikrotiterplatte			
		1	2	3	4
Reihenbezeichnungen	A	NaCl [50µl]	NaCl [50µl]	Verdünnung B Probe 1 [50µl]	Verdünnung B Probe 1 [50µl]
	B	S5 [50µl]	S5 [50µl]	Verdünnung B Probe 2 [50µl]	Verdünnung B Probe 2 [50µl]
	C	S4 [50µl]	S4 [50µl]	Verdünnung B Probe 3 [50µl]	Verdünnung B Probe 3 [50µl]
	D	S3 [50µl]	S3 [50µl]	Verdünnung B Probe 4 [50µl]	Verdünnung B Probe 4 [50µl]
	E	S2 [50µl]	S2 [50µl]	Verdünnung B Probe 5 [50µl]	Verdünnung B Probe 5 [50µl]
	F	S1 [50µl]	S1 [50µl]	Verdünnung B Probe 6 [50µl]	Verdünnung B Probe 6 [50µl]
	G	-----	-----	Etc.	Etc.
	H	-----	-----	Etc.	Etc.

Für die Farbreaktion wurde jedem Well schließlich 200 µl Coomassie-Blue-Lösung hinzugefügt. Die Extinktion in den Näpfen der Platte konnte danach im Plate Reader („Sunrise“, Fa. Tecan, Grödig, Österreich; gesteuert über Computer mit Magellan V.5.00) bei 595 nm ausgewertet werden (Abb. 11). Über eine Regressionsanalyse, die von der Software

Magellan V. 5.00 automatisch ausgeführt wird, wurden die Proteinkonzentrationen errechnet. Da der lineare Bereich der Regressionsgerade eng ist, wurden nur die Proteinkonzentrationen der Proben herangezogen, die im mittleren Bereich der Kalibrationsgerade lagen und deren Extinktion sich nicht dicht am unteren oder oberen Bereich der Standardgeraden befand. Die erhaltenen Proteinkonzentrationen der Probenverdünnungen wurden auf die Konzentrationen der Homogenate umgerechnet. Zur Normalisierung der BR-Mengen, die pro Probe ermittelt wurden, wurden die Proteinmengen pro Ansatz (je Volumen in den Assay eingetragen) errechnet und herangezogen.

Abbildung 11 zeigt ein Beispiel eines Bradford Assays nach Zugabe der Coomassie-Blue-Lösung. Spalten 1 und 2 wurden für die Kalibrationsgerade verwendet. Ab Reihe 3 und 4 wurden die Proben in Duplikaten aufgetragen. Bei der Kalibrationsgerade (Spalten 1 und 2, Reihe A-F) ist eine Intensivierung des Blautons mit steigender Proteinkonzentration deutlich zu sehen.

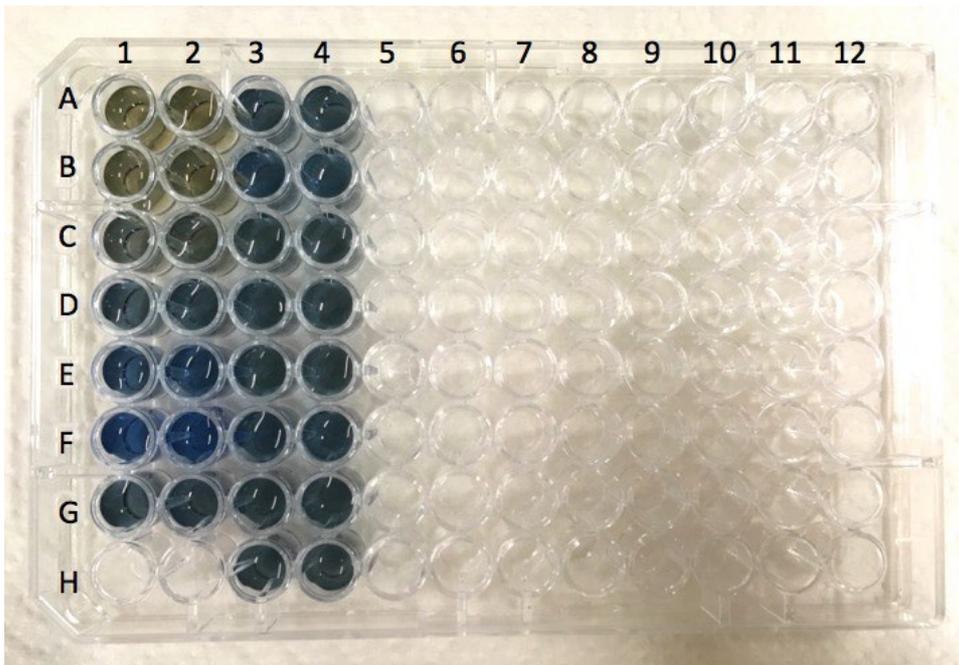


Abb. 11: Darstellung einer befüllten Mikrotiterplatte zur Proteinbestimmung nach Bradford mit NaCl-Lösung (0,9%) als Leerwert, BSA-Standards und Proben nach Zugabe von Coomassie-Blue-Lösung. In Spalte 3 und 4 befinden sich die Proben in Duplikaten. Man kann die Blaufärbung in Abhängigkeit der Proteinkonzentration gut in den Wells A-F der Spalten 1 und 2 (Standards der Kalibrationsgerade in Duplikaten) erkennen (Eigene Darstellung).

3.8 Vorversuche

3.8.1 Optimierung der BR-Ausbeute im Zuge der HO-Aktivitätsbestimmung

Um die optimalen Reaktionsbedingungen für jedes Gewebe zu gewährleisten, wurde in Vorversuchen mit den in Kapitel 3.3. hergestellten Homogenaten der Kontrolltiere und einem Teil des Pools zunächst die notwendige Menge an zugesetztem Häm überprüft, weil eine zu hohe Dosierung die photometrische Messung des Endproduktes BR stören kann. Dies ist insbesondere dann relevant, wenn die HO-Aktivität der Gewebe gering, also die gebildete Menge BR sehr niedrig ist. Häm wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen mit Hirnhomogenat getestet: 4 bzw. 40 nmol (finale Stoffmenge) Hämin. Da die gebildete Menge BR bei der niedrigen Häminkonzentration nicht signifikant weniger war (Daten werden nicht gezeigt), wurden 4 nmol Hämin für den HO-Assay standardmäßig eingesetzt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob durch verschiedene Zusätze die Ausbeute an BR im HO-Assay erhöht werden kann. Dabei wurden zwei Herangehensweisen getestet. Einerseits sollte durch Zugabe des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT, 160 nmol finale Stoffmenge) bzw. des Eisenchelators Deferoxamin (DFO, 800 nmol finale Stoffmenge) zum Assay getestet werden, ob sich die Effizienz der biochemischen Reaktion steigern lässt. Andererseits wurde untersucht, ob sich durch Zugabe von Coffein im Anschluss an die biochemische Reaktion die Extraktion verbessern lässt.

DTT, DFO und Coffein wurden in Duplikaten ohne Negativkontrolle in allen acht Kombinationsmöglichkeiten getestet (Tab 11). Das verwendete Homogenat stammte aus Milzgewebe welches eine hohe intrinsische HO-Aktivität aufweist und mir für die Vorversuche zur Verfügung gestellt wurde. Das Homogenat wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.8.2 Pipettierschema des HO-Assays mit diversen Zusätzen

Der Mastermix wurde vorbereitet und bestand aus 84 µl HO-Assay-Puffer und 25 µl Milz-Homogenat. Um immer das gleiche Endvolumen zu erreichen, wurden DFO, DTT und Coffein mit gleichem Volumen HO-Assay-Puffer ersetzt, wenn sie in der Testreihe fehlten. Nach der bekannten Vorgehensweise, wie bereits in Kapitel 3.4.2 ausführlich beschrieben, wurde im Anschluss an die Zugabe von NADPH für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Abschließend wurde allen Proben 1 ml Benzol hinzugefügt, gevortext und zentrifugiert und die organische Phase geerntet.

Tabelle 11: Pipettierschema des HO-Assays mit den Zusätzen DFO, DTT und Coffein³

Nr.	Name	Mastermix [μ l]	HO- Assay- Puffer [μ l]	DTT 20 mM [μ l]	DFO 100 mM [μ l]	Hämin 10 mM [μ l]	NADPH 10 mM [μ l]	HO- Assay- Puffer [μ l]	Inkub. [37°C]
#1	Alles	109	----	8	8	4	25	----	Für 30 Min.
#2	Alles	109	----	8	8	4	25	----	
#3	Nichts	109	16	----	----	4	25	50	
#4	Nichts	109	16	----	----	4	25	50	
#5	DFO COFF	109	8	----	8	4	25	----	
#6	DFO COFF	109	8	----	8	4	25	----	
#7	COFF	109	16	----	----	4	25	----	
#8	COFF	109	16	----	----	4	25	----	
#9	DTT DFO	109	----	8	8	4	25	50	
#10	DTT DFO	109	----	8	8	4	25	50	
#11	DTT	109	8	8	----	4	25	50	
#12	DTT	109	8	8	----	4	25	50	
#13	DTT COFF	109	8	8	----	4	25	----	
#14	DTT COFF	109	8	8	----	4	25	----	
#15	DFO	109	8	----	8	4	25	50	
#16	DFO	109	8	----	8	4	25	50	

³ Das Endvolumen der wässrigen Komponenten sollte standardmäßig 250 μ l ausmachen. Porphyrine wurden stets in einem fixen Volumen von 4 μ l zugesetzt. Daher ist das Gesamtvolumen zuzüglich DMSO/Hämin 254 μ l

Nr.	Coffein 0,25 M [μ l]	KCl gesättigt [μ l]	Endvol [μ l]	C ₆ H ₆ [μ l]
#1	50	50	254	1000
#2	50	50	254	1000
#3	----	50	254	1000
#4	----	50	254	1000
#5	50	50	254	1000
#6	50	50	254	1000
#7	50	50	254	1000
#8	50	50	254	1000
#9	----	50	254	1000
#10	----	50	254	1000
#11	----	50	254	1000
#12	----	50	254	1000
#13	50	50	254	1000
#14	50	50	254	1000
#15	----	50	254	1000
#16	----	50	254	1000

3.9 Datenauswertung und Statistik

Jedes Homogenat wurde im Duplikat gemessen. Die Messergebnisse der BR-Konzentration der Duplikate wurden mit der Negativkontrolle bereinigt und mit der Proteinmenge im Assay normalisiert. Die proteinnormalisierte BR-Konzentration entspricht somit der HO-Aktivität (nmol BR/mg Protein), welche in 30 Minuten gebildet wurde.

Die Auswertung der Optimierung des HO-Assays durch diverse Zusätze (Abb. 12) erfolgte über die Darstellung der HO-Aktivität. Dafür wurden die ermittelten Aktivitäten innerhalb der Zusatzgruppen gemittelt und der Standardfehler angegeben. Für die Auswertung der Einzeltiere (Abb. 13 bis 16) wurde die Standardabweichung der Duplikate bestimmt. Nach Aufarbeitung und Messung der Proben, übermittelten wir die Werte der Einzeltiere an das Labor von Prof. Barbara Kofler. Uns wurde daraufhin die Gruppenzugehörigkeit der Tiere bekanntgegeben, was eine weitergehende statistische Auswertung ermöglichte. Beim Vergleich der HO-Aktivitäten zwischen den Gruppen (Abb. 17) wurde der Gruppenmittelwert

errechnet und die Streuung als Standardfehler angegeben. Für alle Auswertungen, Visualisierungen und die statistische Auswertung wurde das Programm Excel (Microsoft Office 2010) verwendet. Die Gruppenwerte wurden mit dem Student's t-Test (zweiseitig, ungepaart) auf signifikante Unterschiede analysiert. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnis der Optimierung der BR-Ausbeute im Zuge der HO-Aktivitätsbestimmung

Die Menge an BR, welche im Rahmen des HO-Assays gemessen wird, wird möglicherweise von verschiedenen Bedingungen beeinflusst. In den Vorversuchen ging es darum die Ausbeute an BR im HO-Assay zu erhöhen. Durch Zugabe von DTT, einem Reduktionsmittel, und DFO, einem Eisenchelator, wurde versucht die Reaktionseffizienz (Produktion von BR) zu steigern (i). Coffein wurde eingesetzt, um die Extraktionseffizienz des BR zu erhöhen (ii). Um einen Vergleich möglich zu machen, wurde Milz, ein Gewebe mit hoher intrinsischer HO-Aktivität verwendet.

- i) In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von DTT (0,64 mM finale Konzentration) die Bildung von BR in der Reaktion auf etwa ein Viertel hemmt (Abb. 12). Demgegenüber konnte durch Zugabe von DFO (3,2 mM) die Ausbeute um etwa 50% erhöht werden (Abb. 12).
- ii) Durch Zusatz von Coffein (10 mM) konnte die Extraktionseffizienz bis zu 100% gesteigert werden (Abb. 12)

Die Auswertung zeigt, dass der Zusatz von DFO in Kombination mit Coffein die im Extrakt befindliche BR-Menge verdreifacht hatte (Abbildung 12).

Auf diese Weise entstand der finale HO-Assay, der für die Analyse der Gewebeprobe eingesetzt und in Kapitel 3.4.2 (Tab. 3) beschrieben wurde.

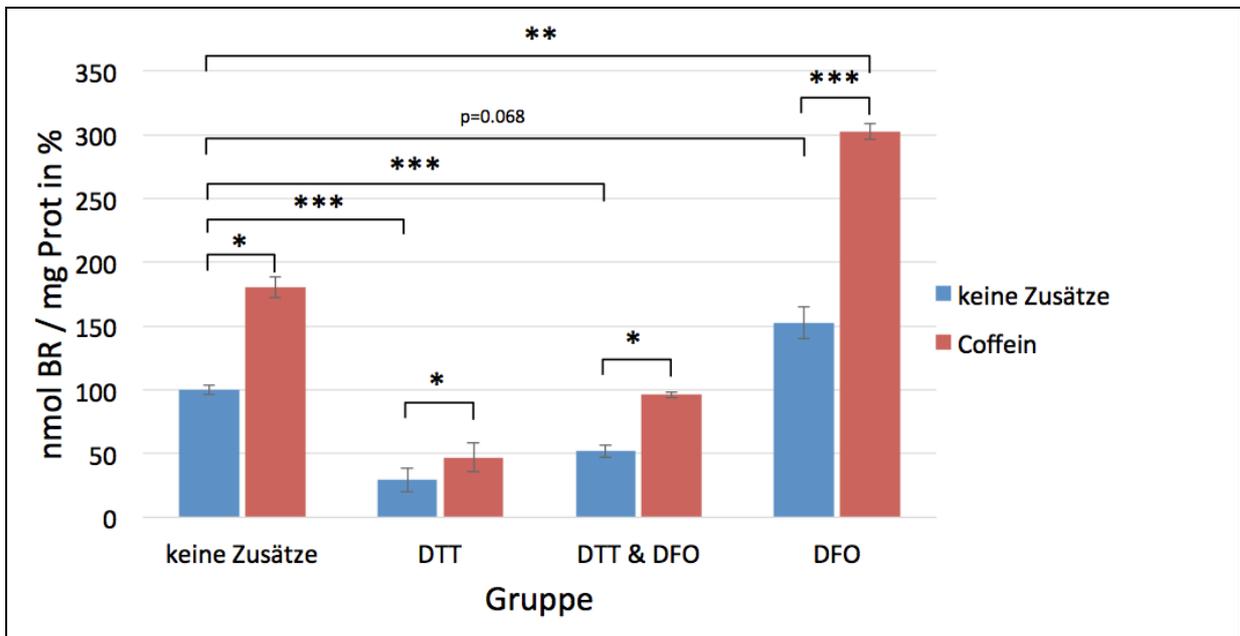


Abb. 12: Einfluss verschiedener Zusätze auf die BR-Ausbeute im HO-Assay zur Bestimmung HO-Aktivität. Zugabe von Deferoxamin (DFO, 3,2 mM) und Dithiothreitol (DTT, 0,64 mM) zu Milzhomogenat wurde getestet, um die Bildung von BR während der Reaktion zu steigern und erfolgte vor Inkubation des Reaktionsgemisches. Die Extraktion wurde ohne (blaue Balken) und im Vergleich dazu mit Coffein (rote Balken; 10 mM) durchgeführt. Alle Werte wurden proteinnormalisiert (nmol BR / mg Protein) und sind bezogen auf die unbehandelte Kontrolle in % dargestellt (Y-Achse, nmol BR / mg Prot in %). Alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardfehler dargestellt (n=3). Die Messungen wurden durchgeführt wie in Kapitel 3.5 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Student's t-Test (zweiseitig, ungepaart) erhoben (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$).

4.2 Messung der HO-Aktivität in den Gewebeproben

Die Gewebeproben aus der Kooperationsstudie mit der PMU wurden wie in Material und Methoden beschrieben verarbeitet. Die Abbildungen 13-16 zeigen die Ergebnisse der Einzeltiere in den verschiedenen Geweben (Tumor, Abb. 13; Leber, Abb. 14; Hirn, Abb. 15; und Niere Abb. 16). Zum Teil unterscheiden sich die Messwerte deutlich voneinander. Die größten Unterschiede zwischen den Einzeltieren wurden in den Tumorproben der Kontrolltiere gefunden. Es ist jedoch zu erkennen, dass bei allen Messwerten die Variation zwischen den Duplikaten sehr gering ist, was zeigt, dass die Bestimmung zuverlässig funktioniert hat. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen dem Erscheinungsbild der Gewebeprobe (hämorrhagisch) und den erhaltenen HO-Aktivitäten gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden sämtliche Messwerte für die Berechnung der Gruppenmittelwerte herangezogen.

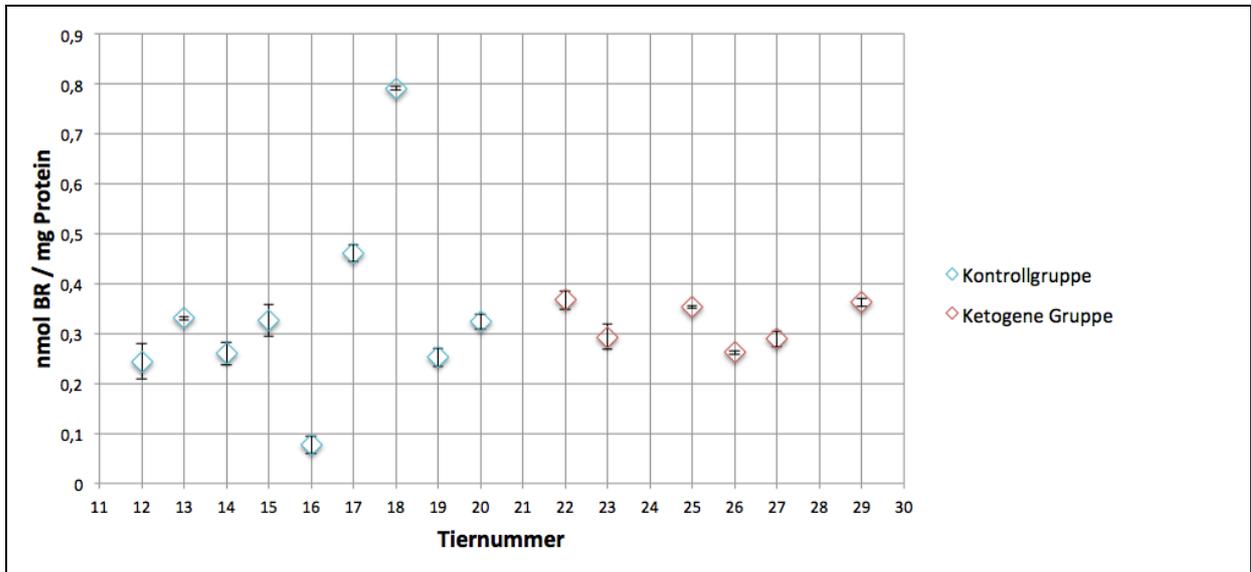


Abb. 13: HO-Aktivität der Tumorproben der Einzeltiere. Die blauen Rauten zeigen die gemittelten BR-Mengen der Tumorhomogenate der Tiere in der Kontrollgruppe (n=9), Die roten Rauten zeigen die gemittelten BR-Mengen der Tumorhomogenate der Tiere in der Gruppe mit ketogener Ernährung (n=6). Die HO-Aktivität ist angegeben in nmol BR / mg Protein pro 30 min (nmol/mg Protein). Die Fehlerindikatoren beziehen sich auf die SD der Duplikate. Alle Messergebnisse wurden Negativkontrollbereinigt.

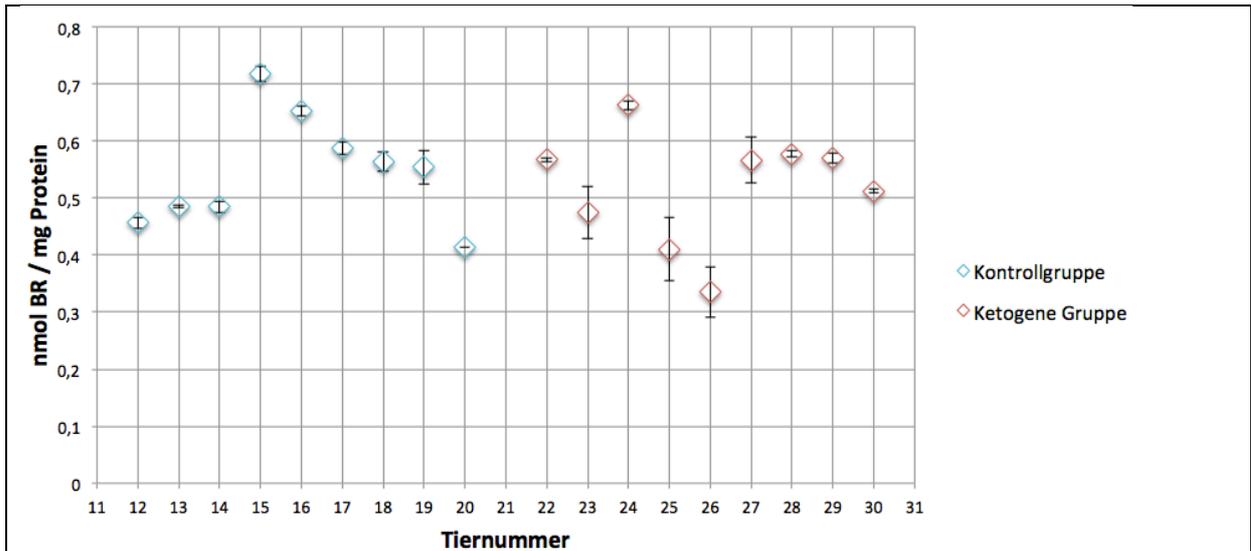


Abb. 14: HO-Aktivität der Leberproben der Einzeltiere. Die blauen Rauten zeigen die gemittelten BR-Mengen der Leberhomogenate der Tiere in der Kontrollgruppe (n=9), Die roten Rauten zeigen die gemittelten BR-Mengen der Leberhomogenate der Tiere in der Gruppe mit ketogener Ernährung (n=9). Die HO-Aktivität ist angegeben in nmol BR / mg Protein pro 30 min (nmol/mg Protein). Die Fehlerindikatoren beziehen sich auf die SD der Duplikate. Alle Messergebnisse wurden Negativkontrollbereinigt.

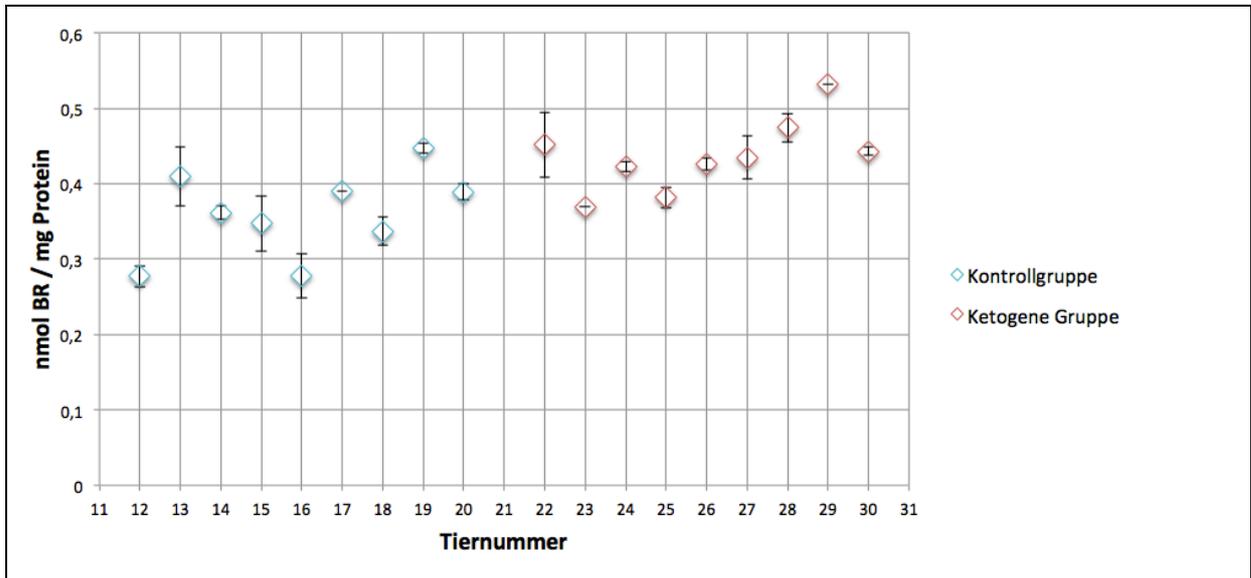


Abb. 15: HO-Aktivität der Hirnproben der Einzeltiere. Die blauen Rauten zeigen die gemittelten BR-Mengen der Hirnhomogenate der Tiere in der Kontrollgruppe (n=9). Die roten Rauten zeigen die gemittelten BR-Mengen der Hirnhomogenate der Tiere in der Gruppe mit ketogener Ernährung (n=9). Die HO-Aktivität ist angegeben in nmol BR / mg Protein pro 30 min (nmol/mg Protein). Die Fehlerindikatoren beziehen sich auf die SD der Duplikate. Alle Messergebnisse wurden Negativkontrollbereinigt.

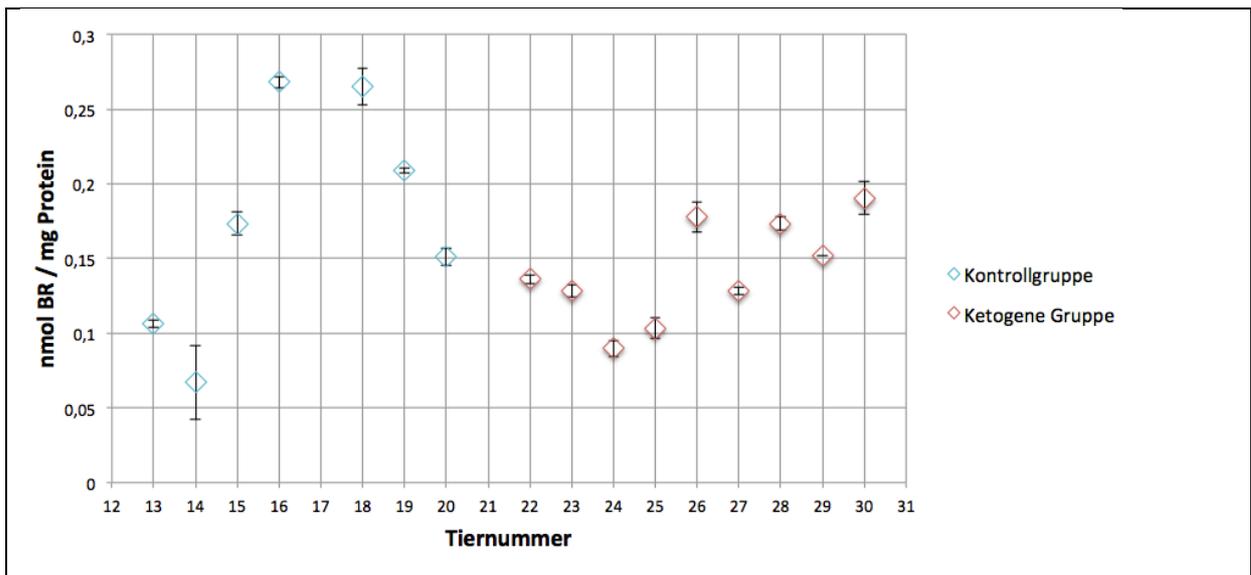


Abb. 16: HO-Aktivität der Nierenproben der Einzeltiere. Die blauen Rauten zeigen die gemittelten BR-Mengen der Nierenhomogenate der Tiere in der Kontrollgruppe (n=7). Die roten Rauten zeigen die gemittelten BR-Mengen der Nierenhomogenate der Tiere in der Gruppe mit ketogener Ernährung (n=9). Die HO-Aktivität ist angegeben in nmol BR / mg Protein pro 30 min (nmol/mg Protein). Die Fehlerindikatoren beziehen sich auf die SD der Duplikate. Alle Messergebnisse wurden Negativkontrollbereinigt.

In Abb. 17 sind die gemittelten HO-Aktivitäten der vier Gewebetypen für die Kontrollgruppe und im Vergleich dazu für die ketogene Gruppe dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Leber die höchste HO-Aktivität aufweist, während in der Niere die niedrigsten Aktivitäten gemessen wurden. Bei den ketogen ernährten Tieren ist tendenziell eine niedrigere HO-Aktivität in Tumor, Leber und Niere zu erkennen. Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Beim Hirn ist hingegen die HO-Aktivität in der ketogen ernährten Tiergruppe signifikant höher ($p = 0,007$). Die ketogene Ernährung hat somit die HO-Aktivität im Gehirn erhöht.

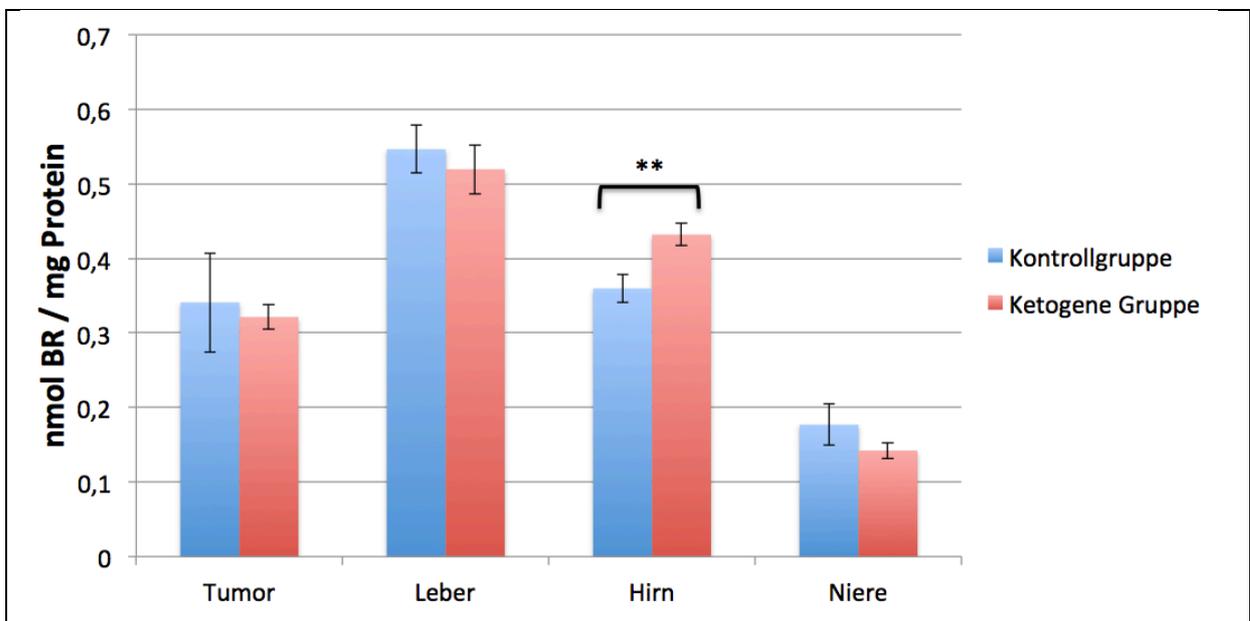


Abb. 17: Effekt von ketogener Ernährung auf die HO-Aktivitäten in den Geweben Tumor, Leber, Hirn und Niere von Mäusen nach Tumorimplantation und Chemotherapie. Die blauen Balken stellen die gemittelten Werte der Einzeltiere der Kontrollgruppe, die roten Balken stellen die gemittelten Werte der Einzeltiere der ketogenen Gruppe dar in den jeweiligen Geweben (Tumor, Kontrollgruppe $n=9$; ketogene Gruppe $n=6$; Leber, Kontrollgruppe $n=9$; ketogene Gruppe $n=9$; Hirn, Kontrollgruppe $n=9$; ketogene Gruppe $n=9$; Niere, Kontrollgruppe $n=7$; ketogene Gruppe $n=9$). Die Daten sind als Mittelwerte (\pm Standardfehler) dargestellt. Die Messungen wurden durchgeführt wie in Kapitel 3.5 beschrieben und die erhaltene Menge BR wurde proteinnormalisiert (nmol BR / mg Protein). Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Student's t-Test (zweiseitig, ungepaart) analysiert und die Signifikanz dargestellt (** $p < 0,01$).

5 Diskussion

5.1 Optimierung des HO-Assays

Dieser erste Teil der Laborarbeit diente dazu die Ausbeute an BR zu erhöhen, um die Messung zu erleichtern. Eine große Menge an gebildetem BR ist anzustreben, denn umso höher die BR-Menge ist, desto zuverlässiger sind die photometrischen Messungen. Deshalb war es wichtig einen Assay zu entwickeln, bei dem die Menge an gebildetem BR nicht limitiert wird und das BR ohne Verlust in das organische Lösungsmittel extrahiert werden kann. Eine Limitierung in der gebildeten Menge BR ist z. B. durch das in der Reaktion freigesetzte Eisen möglich. Dieser Einfluss sollte durch Komplexierung der Eisenionen unterbunden werden. In der Tat kann man erkennen, dass der Zusatz von DFO die BR-Produktion im Assay erhöht.

Die Extraktion von BR wird durch das Vorhandensein von Proteinen im Reaktionsansatz behindert (Mülleber et al. 2015). Um diesen Effekt zu minimieren, kann durch Zusatz von Coffein, ähnlich wie beim Ansatz zur BR-Bestimmung im Serum (Coffein-Zusatz in der Jandrassik-Grof-Methode, vgl. Vink et al. 1986), die BR-Dissoziation von den Proteinen gefördert werden. Wir nahmen an, dass durch die Zugabe von Coffeinlösung zur Extraktion auch mehr BR in die apolare Phase extrahiert werden kann. Dies wurde durch unsere Untersuchungen bestätigt.

Die gebildete Menge BR wird nach der Proteinnormalisierung als HO-Aktivität ausgedrückt. Die dadurch entstandenen HO-Aktivitäten können nur verglichen werden, wenn der exakt selbe Assay verwendet wird.

5.2 Ketogene Gruppe vs. Kontrollgruppe

Bei Mäusen mit implantierten Tumoren sollte unterschieden werden, in wie weit die beobachtete Reduktion der Tumore bei ketogen gefütterten Tieren auf eine veränderte HO-Aktivität zurückgeführt werden kann. Dazu wurde die HO-Aktivität im Tumorgewebe und im Vergleich dazu in Leber, Niere und Hirn in einer geblindeten Art und Weise erhoben.

Die Leber weist generell die höchste und die Niere die niedrigste HO-Aktivität auf. In beiden Geweben ist in der ketogenen Gruppe die HO-Aktivität wie erwartet niedriger als in der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant. Es ist bekannt, dass die HO durch den

Energiestoffwechsel moduliert wird. Vorherige Studien legen nahe, dass ein Überangebot an Energiesubstraten, wie sie in der sogenannten *western diet* üblich ist, zum metabolischen Syndrom führt, das durch eine erhöhte HO-1 in Makrophagen induziert wird (Jais et al. 2014). Darum ist es durchaus denkbar, dass die Umstellung des Energiestoffwechsels auf ketogene Ernährung zu einer Verminderung der HO-Aktivität führen müsste. Diese Annahme wird durch unsere Daten unterstützt. Obwohl nicht signifikant, zeigen alle untersuchten Gewebe, mit Ausnahme des Hirns, eine moderate Verringerung der HO-Aktivität.

Überraschenderweise konnten wir im Gewebe Gehirn einen entgegengesetzten Effekt der ketogenen Diät nachweisen. Dort wurde in der ketogenen Gruppe eine signifikant erhöhte HO-Aktivität gemessen. Eine Erklärung hierfür könnten die Forschungsergebnisse von Milder et al. (2010) liefern, wonach eine ketogene Ernährung oxidativen Stress induziert. Durch den Wegfall von Glukose als Energielieferant stellen die Mitochondrien der Leber Ketonkörper wie Betahydroxybutyrat her. Der Zellstress bei der Umstellung von Glukose auf Ketonkörper aktiviert den Wachstumsfaktor Nrf2 (He et al. 2001). Dieser reguliert die Expression antioxidativer Proteine wie der HO-1 und dem daraus entstehenden BR. Es kann somit sein, dass Nervenzellen die HO-Aktivität raufregulieren um von ihrer Wirkung zu profitieren und sich so zu schützen. Nach Milder et al. (2010) findet während einer ketogenen Diät auch in der Leber eine Aktivierung von Nrf2 statt. Da aber die HO-Aktivität von beiden katalytisch aktiven Proteinen (HO-1 und HO-2) beigesteuert wird, kann dieser Mechanismus nur durch eine Analyse der RNA- bzw. Proteinexpression bestätigt werden. Die Publikation von Milder et al. (2010) ist auch deshalb kritisch zu hinterfragen, weil keine Originalwesternblots oder die detektierte Proteingröße von Nrf2 angegeben sind.

Bei den implantierten Tumoren handelte es sich um Neuroblastomzellen. Diese sind entartete Neuroblasten, also neuronale Vorläuferzellen. Wie viele andere Tumore besitzen auch sie einen veränderten Glukosestoffwechsel. Die Produkte der Glykolyse gelangen nicht mehr in den Zitratzyklus, der sich in den Mitochondrien abspielt. Die Energiegewinnung passiert durch anaerobe Glykolyse, selbst wenn genug Sauerstoff vorhanden ist (Liberti et al. 2016). Der Glukoseverbrauch steigt somit an. Ein Neuroblastom ist charakterisiert durch eine generalisierte Reduktion der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (Morscher et al. 2015). Somit wird weniger wahrscheinlich aerobe Glykolyse ablaufen. Auch eine Änderung der Nährstoffversorgung ändert die Phosphorylierungsaktivität nicht, wie in gerade genannter Publikation gezeigt wurde. Es fehlen die mitochondrialen Enzyme um Ketonkörper umzusetzen. Da das Neuroblastom durch die ketogene Diät besser durch eine

Chemotherapie reduziert werden konnte (Aminzadeh-Gohari et al. 2017), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Umstellung des Energiestoffwechsels sowohl die Tumorentstehung als auch die Metastasierung senke. Allerdings ist nicht bekannt, ob dies auch mit einer erhöhten HO-Aktivität im gesamten Tumorgewebe assoziiert ist. Tendenziell ergaben sich in der Tat niedrigere HO-Aktivitäten in allen Geweben, mit Ausnahme von Hirngewebe. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei Tumorgewebe um heterogenes Gewebe handelt und nicht um eine Zellkultur mit uniformen Neuroblastomzellen. Nach Injektion der Neuroblastomzellen in die Flanke der Tiere wandern körpereigene Zellen in den entstehenden Tumor ein. Damit ist das Tumorgewebe eine heterogene Mischung an Zelltypen, die alle in unterschiedlichem Ausmaß zur HO-Aktivität beitragen können. Zu den Neuroblastomzellen gibt es sehr unterschiedliche Angaben. In einer Publikation von Furfaro et al. (2014) wurde beschrieben, wie Neuroblastomzellen ihre HO-Expression heraufregulieren, wenn sie durch chemotherapeutische Behandlungen Zellstress bekommen. Die ketogene Ernährung löst auch Zellstress aus und führt vielleicht gerade deshalb nicht zu niedrigeren HO-Aktivitäten. Wie bei Nervenzellen beschrieben, könnte es zur Aktivierung des Nrf2 Wachstumsfaktors kommen.

6 Conclusio

Zu Beginn ist anzumerken wie wichtig die Zusammensetzung des HO-Assays ist. Durch Zugabe von DFO und Coffein vor der Extraktion ließ sich die Bildung von BR während der Reaktion um das Dreifache steigern.

Die Analysen haben ergeben, dass die Tumorproben der Tiere, die mit ketogener Diät gefüttert wurden, keine signifikant niedrigere HO-Aktivität aufwiesen. Die HO-Aktivitäten in den Geweben Leber, Niere und Tumor zeigten einen Trend zu niedrigeren Werten in der ketogen gefütterten Gruppe. Spannend ist, dass im Hirngewebe eine signifikante Erhöhung der HO-Aktivität sichtbar war. Dies könnte einen Schutzmechanismus der Nervenzellen darstellen, die von der antioxidativen Wirkung der HO profitieren.

Da die HO-Aktivität im Tumorgewebe (wenn auch nicht signifikant) erniedrigt war, ist nicht ausgeschlossen, dass die HO an der Tumorreduktion beteiligt war. Die Hypothese ist widerlegt. Auch wenn zum Analysezeitpunkt keine signifikanten Unterschiede nachweisbar waren, muss das nicht bedeuten, dass die HO während der gesamten Zeit der Diät auch unverändert war. Wie bereits erwähnt muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass Tumorgewebe ein sehr heterogenes Material ist. Nicht nur die implantierten Neuroblastomzellen, sondern auch die eingewanderten Zellen des Wirtstieres sind in unterschiedlichem Umfang vorhanden. Wir haben lediglich ein Stück des Tumors zur Analyse bekommen. Dieses Stück muss nicht repräsentativ sein für den Rest des Tumors. Es ist möglich, dass auf Zellebene sehr wohl Unterschiede in der HO-Aktivität sichtbar wären.

Insgesamt kann trotzdem davon ausgegangen werden, dass ketogene Ernährung einen Einfluss auf das Tumorwachstum ausübt und somit positive Effekte für die Therapie von Neoplasien zu erwarten sind. Welche Rolle die HO in diesem Zusammenhang spielt, bleibt offen. Um eine Beteiligung der HO nachweisen zu können, muss man vielleicht eine andere experimentelle Strategie verfolgen: So bleibt einerseits die Frage, ob ein anderer Zeitpunkt, z. B. möglichst zu Beginn der Chemotherapie, geeigneter wäre. Auch könnte man versuchen die Zelltypen vor der Analyse zu trennen, oder die HO während des Versuchs zu modulieren.

Da die HO-Aktivität innerhalb der verschiedenen Gruppen eine sehr hohe Variation aufwies, wäre eine Wiederholung des Versuchs mit größerer Stichprobe eine Möglichkeit, die statistische Aussagekraft zu erhöhen.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der HO-Aktivität in Geweben ketogen ernährter Mäuse mit experimentell implantierten Tumoren nach Chemotherapie. Aminzadeh-Gohari et al. (2017) konnten zeigen, dass eine ketogene Diät in Verbindung mit Chemotherapie das Tumorwachstum hemmt. Unsere Hypothese lautete, dass die ketogene Diät wegen einer erniedrigten HO-Aktivität im Tumorgewebe zu einer höheren Effizienz der Chemotherapie geführt hat.

Bei meiner Diplomarbeit handelt es sich um eine Kooperationsstudie mit der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Salzburg (PMU). Die Gewebeproben, welche uns zur Verfügung gestellt wurden, stammten aus einem experimentellen Mausmodell (Aminzadeh-Gohari et al. 2017), welches im Labor von Frau Prof. Barbara Kofler an der PMU durchgeführt wurde. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die HO-Aktivität in Tumor-, Leber-, Hirn- und Nierengewebe von Mäusen untersucht, die ketogen und nicht ketogen ernährt wurden. Die Proben wurden ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit aufgearbeitet und analysiert (Blindstudie).

Die Gewebestückchen wurden homogenisiert. Zum Homogenat wurden Puffer, DFO, Hämin und NADPH hinzugefügt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden Coffein-Lösung und KCl dazu pipettiert. Abschließend wurde 1 ml Benzol hinzugefügt und die obere organische Phase geerntet, in der sich nun das entstandene BR gelöst hatte. Die Quantifizierung der BR-Mengen passierte photometrisch. Dazu wurde im Vorfeld eine BR-Kalibrationsgerade erstellt. Zur Normalisierung der im HO-Assay produzierten Bilirubinmengen wurde die Proteinkonzentration der Homogenate herangezogen. Die Proteinbestimmung wurde mithilfe eines Bradford-Assays durchgeführt. Die gebildete Menge BR wird nach der Proteinnormalisierung in HO-Aktivität ausgedrückt. Für alle Visualisierungen und die statistische Auswertung wurde das Programm Excel (Microsoft Office 2010) verwendet. Die Gruppenwerte wurden mit dem Student's t-Test (zweiseitig, ungepaart) auf signifikante Unterschiede analysiert. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Die Bildung von BR während der Reaktion ließ sich um das Dreifache steigern, wenn vor der Extraktion DFO und Coffein hinzugefügt wurden. Die HO-Aktivitäten waren in den Geweben Leber, Niere und Tumor tendenziell niedriger. Im Hirngewebe war eine signifikante Erhöhung

der HO-Aktivität sichtbar. Inwieweit ketogene Ernährung einen Einfluss auf die HO-Aktivität in unterschiedlichen Geweben hat, konnte nicht vollständig geklärt werden.

8 Summary

The present work analysed the HO-activity in tissues of mice with experimentally implanted tumors fed with ketogenic diet following chemotherapy. Aminzadeh-Gohari et al. (2017) were able to show that a ketogenic diet combined with chemotherapy inhibits tumor growth. Our hypothesis was, that the ketogenic diet led to a higher efficiency of chemotherapy because of decreased HO-activity in tumor tissue.

My diploma thesis is a cooperation study with the Paracelsus Medical Private University (PMU). The tissue samples, that were made available to us, came from an experimental mouse model (Aminzadeh-Gohari et al. 2017), which was carried out in the laboratory of Prof. Barbara Kofler at PMU. In the context of this diploma thesis, the HO activity in tumor, liver, brain and kidney tissue of mice that were fed ketogenic and non-ketogenic was investigated. The samples were processed and analyzed without knowledge of the group to which they belonged (blind study)

The tissue samples were homogenized. Buffer, DFO, hemin and NADPH were added to the homogenate. After a 30-minute incubation at 37°C., caffeine solution and KCl were added. Finally, 1 ml of benzene was added and the upper organic phase, in which the resulting BR had now dissolved, could be harvested. The quantification of the amounts of BR was done photometrically. For this purpose, a BR calibration line was created in advance. The protein concentration of the homogenates was used to normalize the amounts of bilirubin produced in the HO-assay. The protein determination was carried out using a Bradford assay. The amount of BR formed is expressed in HO-activity after protein normalization. For all visualizations and statistical analysis the Excel program (Microsoft Office 2010) was used. The group values were analyzed for significant differences using the Student's t-test (two-sided, unpaired). A p-value <0.05 was considered as significant.

The formation of BR during the reaction could be increased threefold when DFO and caffeine were added before the extraction. The HO activities tended to be lower in the liver, kidney and tumor tissues. A significant increase in HO activity was visible in the brain tissue. The extent to which the ketogenic diet has an influence on HO activity could not be fully clarified.

9 Literaturverzeichnis

Aminzadeh-Gohari S., Feichtinger R.G., Vidali S., Locker F., Rutherford T., O'Donnell M., Stöger-Kleiber A., Mayr J.A., 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.

Di Biase S., Lee C., Brandhorst S., Manes B., Buono R., Cheng C.-W., Cacciottolo M., Martin-Montalvo A., de Cabo R., Wei M., Morgan T.E., Longo V.D. 2016. Fasting-Mimicking Diet Reduces HO-1 to Promote T Cell-Mediated Tumor Cytotoxicity. *Cancer Cell – Cell Press*, 30(1):136-146.

Dulak J., Deshane J., Jozkowicz A., Agarwal A. 2008. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation* 117(2):231-241.

Duvigneau, J. C., Esterbauer, H., & Kozlov, A. V. 2019. Role of Heme Oxygenase as a Modulator of Heme-Mediated Pathways. *Antioxidants*, 8(10), 475.

Duvigneau, J. C., & Kozlov, A. V. 2017. Pathological Impact of the Interaction of NO and CO with Mitochondria in Critical Care Diseases. *Frontiers in medicine*, 4, 223.

Duvigneau, J. C., Trovato, A., Müllebner, A., Miller, I., Krewenka, C., Krenn, K., Zich, W., & Moldzio, R. 2020. Cannabidiol Protects Dopaminergic Neurons in Mesencephalic Cultures against the Complex I Inhibitor Rotenone Via Modulation of Heme Oxygenase Activity and Bilirubin. *Antioxidants*, 9(2), 135.

Ferrándiz M.L., Devesa I. 2008. Inducers of heme oxygenase-1. *Current Pharmaceutical Design* 14(5):473-86.

Fiedler H. 2019. Hämoxygenase. In: Gressner A.M. und Arndt T. Hrsg. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Dritte Auflage. Wiesbaden: Springer, 1062.

Furfaro A. L., Piras S., Passalacqua M., Domenicotti C., Parodi A., Fenoglio D., Pronzato M. A., Marinari U. M., Moretta L., Traverso N., Nitti M. 2014. HO-1 up-regulation: a key point in high-risk neuroblastoma resistance to bortezomib. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842(4):613-22.

He C.H., Gong P., Hu B., Stewart D., Choi M.E., Choi A.M., Alam J. 2001. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *Journal of Biological Chemistry* 276(24):20858-20865.

Jais A., Einwallner E., Sharif O., Gossens K., Lu T.T., Soyal S.M., Medgyesi D., Neureiter D., Paier-Pourani J., Dalgaard K., Duvigneau J.C., Lindroos-Christensen J., Zapf T.C., Amann S., Saluzzo S., Jantscher F., Stiedl P., Todoric J., Martins R., Oberkofler H., Müller S., Hauser-Kronberger C., Kenner L., Casanova E., Sutterlüty-Fall H., Bilban M., Miller K., Kozlov A.V., Krempler F., Knapp S., Lumeng C.N., Patsch W., Wagner O., Pospisilik J.A., Esterbauer H. 2014. Heme oxygenase-1 drives metaflammation and insulin resistance in mouse and man. *Cell*. 158(1):25-40.

Kang X., Kong F., Wu X., Ren Y., Wu S., Wu K., Jiang Z., Zhang W. 2015. High Glucose Promotes Tumor Invasion and Increases Metastasis-Associated Protein Expression in Human Lung Epithelial Cells by Upregulating Heme Oxygenase-1 via Reactive Oxygen Species or the TGF- β 1/PI3K/Akt Signaling Pathway. *Cellular physiology and biochemistry* 35(3):1008-1022.

Kharb S., Halder M., Kundu Z.S. 2020. Heme oxygenase-1 in osteosarcoma. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 16(4):874-877.

Liberti M.V., Locasale J.W. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences* 41(3):211-218.

Loboda A., Jozkowicz A., Dulak J. 2015. HO-1/CO system in tumor growth, angiogenesis and metabolism – Targeting HO-1 as an anti-tumor therapy. *Vascular Pharmacology* 74:11-22.

Luczkowska K., Skolowska K.E., Taryma-Lesniak O., Pastuszek K., Supernat A, Bybjerg-Grauholm J., Hansen L.L., Paczkowska E., Wojdacz T.K., Machalinski B. 2021. Bortezomib induces methylation changes in neuroblastoma cells that appear to play a significant role in resistance development to this compound. *Scientific Reports* 11(1):9846.

Maines M.D., Panahian N. 2001. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 502:249-272.

Mancuso C. 2019. Bilirubin and brain: A pharmacological approach. *Neuropharmacology* 118:113-123.

Maruhashi T., Kihara Y., Higashi Y. 2019. Bilirubin and Endothelial Function. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 26(8):688-696.

Milder J.B., Liang L-P., Patel M. 2010. Acute oxidative stress and systemic Nrf2 activation by the ketogenic diet. *Neurobiology of Disease* 40(1):238-244.

Morscher R.J., Aminzadeh-Gohari S., Feichtinger R.G., Mayr J.A., Lang R., Neureiter D., Sperl W., Kofler B. 2015. Inhibition of Neuroblastoma Tumor Growth by Ketogenic Diet and/or Calorie Restriction in a CD1-Nu Mouse Model. *PLoS One* 10(6):e0129802.

Müllebnner, A., Dorigheo, G. G., Kozlov, A. V., & Duvigneau, J. C. 2018. Interaction between Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Heme Oxygenase, and Nitric Oxide Synthase Stimulates Phagocytosis in Macrophages. *Frontiers in medicine*, 4, 252.

Müllebnner A., Moldzio R., Redl H., Kozlov A.V., Duvigneau J.C. 2015. Heme Degradation by Heme Oxygenase Protects Mitochondria but Induces ER Stress via Formed Bilirubin. *Biomolecules* 5(2):679-701.

Tenhunen R., Marver H.S., Schmid R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 61(2):748-755.

Vink K.L., Schuurman W., van Gansewinkel R. 1986. Use of the caffeine reagent in direct spectrophotometry of bilirubin. *Clinical Chemistry* 32(7):1389-1393.

Zhang S, Xie C. 2017. The role of OXCT1 in the pathogenesis of cancer as a rate-limiting enzyme of ketone body metabolism. *Life Sciences*, 183:110-115.

Zhang X., Yu Y., Lei H., Cai Y., Shen J., Zhu P., He Q., Zhao M. 2020. The Nrf-2/HO-1 Signaling Axis: A Ray of Hope in Cardiovascular Diseases. *Cardiology Research and Practice* 3:1-9.

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Eigene Darstellung

Abb. 2: Eigene Darstellung

Abb. 3: Charles River 2020. Nude Mice-CD-1.

<https://www.criver.com/sites/default/files/noindex/catalogs/rms/cd-1-nude-mice-us-pricing.pdf>
(Zugriff: 10.05.2020).

Abb. 4: Eigene Darstellung

Abb. 5: Eigene Darstellung

Abb. 6: Eigene Darstellung

Abb. 7: Eigene Darstellung

Abb. 8: Eigene Darstellung

Abb. 9: Eigene Darstellung

Abb. 10: Eigene Darstellung

Abb. 11: Eigene Darstellung

Abb. 12: Eigene Darstellung

Abb. 13: Eigene Darstellung

Abb. 14: Eigene Darstellung

Abb. 15: Eigene Darstellung

Abb. 16: Eigene Darstellung

Abb. 17: Eigene Darstellung