

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Medizinischen
Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Die Cardiolipinzusammensetzung korreliert mit der Proliferation von
Prostatakarzinomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Anja Christiane Sapandowski

aus Magdeburg

Magdeburg 2020

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Sapandowski, Anja Christiane:

Die Cardiolipinzusammensetzung korreliert mit der Proliferation von
Prostatakarzinomzellen. - 2020. - 62 Bl., 12 Abb., 1 Tab.

Kurzreferat

Die Diagnose Prostatakarzinom wurde im Jahr 2018 allein in Europa 450.000 Mal gestellt. Diese Tumorentität ist sehr häufig und wächst langsam, sodass ein Eingreifen auch in späteren Phasen durchaus kurativ erfolgen kann. Umso wichtiger ist es Ansatzpunkten, die sich im Bereich der kurativen Forschung in diesem Gebiet ergeben, nachzugehen. Auf Grund der bereits getätigten Forschungen und daraus entstandenen Empfehlungen und der Beeinflussbarkeit von außen durch diätetische Maßnahmen ist die Rolle der Fette in diesem Zusammenhang interessant. Ebenfalls wichtig und relativ neu sind die Mitochondrien als Angriffspunkte für Chemoprävention und Chemotherapie. Diese Arbeit sollte deshalb die Einflüsse von extern zugegebenen Fettsäuren auf die Proliferation von Prostatakrebszellen beurteilen und zwar im Zusammenhang mit der veränderten Zusammensetzung des Cardiolipins, das als Phospholipid fast ausschließlich in der inneren Mitochondrienmembran vorkommt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des Cardiolipins durch externe Fettsäuren variabel ist und auch eine veränderte metabolische Aktivität der Prostatakarzinomzellen aus einem unterschiedlichen Fettsäureangebot resultiert. Linol-, Arachidon-, Stearin- und Ölsäure haben eindeutig antiproliferative Effekte. Außerdem besteht eine positive Korrelation für die metabolische Aktivität der Zellen und den Gehalt an Palmitoleinsäure. Ob sich daraus konkrete Ernährungsempfehlungen ergeben können, sollte Gegenstand weiterer Forschungen *in vivo* sein.

Schlüsselwörter: Prostatakrebs, Freie Fettsäuren, Cardiolipin, Tumorzellproliferation

Inhaltsverzeichnis

DOKUMENTATIONSBLATT	II
KURZREFERAT	II
SCHLÜSSELWÖRTER.....	II
INHALTSVERZEICHNIS.....	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 PROSTATAKREBS	1
1.1.1 Inzidenz und Mortalität.....	1
1.1.2 Aktuelle Therapiemöglichkeiten.....	1
1.1.3 Ernährungsspezifische Risikofaktoren.....	3
1.1.4 Die Bedeutung der Fettsäuren beim Prostatakarzinom	4
1.2 CARDIOLIPIN	5
1.2.1 Das Molekül.....	6
1.2.2 Die Synthese.....	6
1.2.3 Die Funktionen des Cardiolipins.....	8
1.2.4 Cardiolipin und Krebs	8
1.3 ZIELSTELLUNG	10
2 MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1 STUDIENDESIGN	11
2.2 PROSTATAKARZINOMZELLEN	11
2.2.1 Kultivierung der Prostatakarzinomzellen.....	11
2.2.2 Vermehrung der Prostatakarzinomzellen und Zellpassage.....	12
2.2.3 Einfrieren der fünften Passage PC-3 (CRL-1435).....	13
2.2.4 Auftauen der Zellen der fünften Passage und Aussaat in Petrischalen für die Experimente.....	13
2.2.5 Applikation von Zusätzen zu den PC-3-Zellen.....	15
2.3 ANALYSEN	18

2.3.1	<i>Proteinextraktion und spektrophotometrische Bestimmung des Proteingehalts</i>	18
2.3.2	<i>Bestimmung der MTT-Reduktion</i>	18
2.3.3	<i>Bestimmung der Laktatkonzentration</i>	19
2.3.4	<i>Cardiolipinbestimmung</i>	19
2.4	STATISTISCHE ANALYSE	21
2.4.1	<i>Allgemeine Angaben zur Statistik</i>	21
2.4.2	<i>Pearson-Korrelationskoeffizient und Bestimmtheitsmaß</i>	22
3	ERGEBNISSE	23
3.1	EINFLUSS DER FETTSÄUREN AUF DAS WACHSTUM DER PC-3-PROSTATAKARZINOMZELLEN	23
3.1.1	<i>Proteingehalt</i>	23
3.1.2	<i>MTT-Reduktion</i>	27
3.1.3	<i>MTT/Protein</i>	29
3.1.4	<i>Laktatkonzentration</i>	30
3.2	CARDIOLIPIN	31
3.2.1	<i>Zusammensetzung und Verteilung der molekularen Cardiolipinspezies</i>	32
3.2.2	<i>Gesamtcardiolipingehalt und Cardiolipin-Oxidation</i>	33
4	DISKUSSION	38
4.1	ZIEL DER ARBEIT, MATERIAL UND METHODEN	38
4.2	ERGEBNISSE	39
4.2.1	<i>Die Proliferation inhibierende und stimulierende Fettsäuren</i>	39
4.2.2	<i>Lipidmetabolismus und Zellstoffwechsel</i>	42
4.2.3	<i>Cardiolipin</i>	43
4.2.4	<i>Oxidativer Stress und Krebsentstehung</i>	44
4.2.5	<i>Prostatakrebs und Ernährung</i>	45
4.3	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	46
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
	LITERATURVERZEICHNIS	50
	DANKSAGUNG	60
	EHRENERKLÄRUNG	62
	DARSTELLUNG DES BILDUNGSWEGES	63

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Cardiolipinsynthese schematisch nach Ren et al. (Ren, Phoon et al. 2014)</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 2: Arbeitsschritte eines Experimentes.....</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 3: Proteingehalt der Proben nach 4h.....</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 4: Proteingehalt der Proben nach 72h</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 5: Mikroskopisch-fotografische Aufnahmen der Prostatakarzinomzellen nach 72h... Inkubation</i>	<i>26</i>
<i>Abbildung 6: MTT-Reduktion nach 4h.....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 7: MTT-Reduktion nach 72h.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 8: MTT-Reduktion / Protein nach 72h.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 9: Laktatproduktion nach 72h Kultivierung.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 10: Gesamtcardiolipingehalt als Summe der Spezies</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 11: oxidiertes Anteil des Gesamtcardiolipin in % (C18:2)₄</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 12: Gehalt an Palmitoleinsäure im Verhältnis zur Proliferation der..... Prostatakarzinomzellen</i>	<i>35</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verteilung der Cardiolipinspezies.....</i>	<i>37</i>
--	-----------

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AS	Arachidonsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Bovines Serumalbumin Fraktion V (Rinderserumalbumin)
CDP	Cytidindiphosphat
CL	Cardiolipin
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRL-1435	American Tissue Culture Collection Number
CuSO ₄	Kupfersulfat
Cx:y	Fettsäure mit Anzahl der Kohlenstoffatome : Anzahl der Doppelbindungen
DHS	Docosahexaensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii/alia: und Andere
eV	Elektronenvolt
FABP5	fatty acid-binding protein 5 (fettsäurebindendes Protein 5)
FADS	fatty acid desaturase (Fettsäuresaturase)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
g	Gravitationsbeschleunigung
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCL	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HPLC-MS/MS-Analyse	High-Performance-Liquid-Chromatographie- Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LDR	Low dose rate
LNCaP	lymph node carcinoma of the prostate (Prostatakarzinom der Lymphknoten)
LS	Linolsäure
M	molare Masse
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
Met	Methanol

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLCL	Monolyso-Cardiolipin
mM	millimolar
mTorr	Millitorr
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
ÖS	Ölsäure
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PC-3	Prostatakarzinomzellen der Zelllinie 3
PGP	Phosphatidylglycerophosphat
PS	Palmitinsäure
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTFE-Membran	Polytetrafluorethylen-Membran
r	Korrelationskoeffizient

R-Klassifikation	residual-Klassifikation (Einteilung nach Residuen bei Tumoroperationen)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
Sn-1	monomolekulare nucleophile Substitution 1
SRM	selected reaction monitoring
Stau	Staurosporin
StS	Stearinsäure
U	Umdrehungen
UICC	Union International Contre le Cancer (Krebsstadiengruppierung)
V	Volt
v	volume (Volumenanteil in Lösungen)
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar (Mikromol/Liter)

1 Einleitung

1.1 Prostatakrebs

1.1.1 Inzidenz und Mortalität

Jedes Jahr wird von der American Cancer Society die Zahl der neu erkannten Krebserkrankungen und Todesfälle durch Krebs in den Vereinigten Staaten gesammelt. Diese Daten geben Aufschluss über die Entwicklung der Krebsinzidenz und der Mortalität. Im letzten Jahrzehnt blieb die Krebsinzidenzrate bei Frauen stabil, nahm bei Männern sogar circa 2% pro Jahr ab. Auch die Krebsmortalitätsrate ging um circa 1,5% jährlich zurück. Die Gesamtsterblichkeitsrate konnte zwischen 1991 und 2016 um insgesamt 27% gesenkt werden (Siegel, Miller et al. 2019). Europa ist im Jahr 2018 eine wirtschaftlich starke Gemeinschaft, die nur 9% der Weltbevölkerung ausmacht. Der Kontinent vereint aber zur gleichen Zeit 25% der globalen Krebserkrankungen auf sich. 450.000 Fälle davon betreffen die Entität Prostatakrebs (Ferlay, Colombet et al. 2018). Die Konzentration verschiedener Arten von Krebs auf eine, an den Lebensumständen gemessen, hochentwickelte Gesellschaft, wirft die Frage auf, welcher Gefahren sich diese Gemeinschaft aussetzt und was den Unterschied macht zu Bevölkerungen die weniger stark betroffen sind. Das Prostatakarzinom ist die am häufigsten diagnostizierte Krebsart bei Männern und die zweithäufigste Todesursache bei den Karzinomen der männlichen Bevölkerung der USA (Siegel, Miller et al. 2019). Diese Krebsart ist gekennzeichnet durch eine hohe Prävalenz, wächst langsam und bietet wegen der langen Latenzzeit gute Möglichkeiten für eine Intervention (Mandair, Rossi et al. 2014). Allerdings sind wegen der Vielfalt der Entwicklungsstadien Diagnose und Therapie dieser Tumorentität schwierig (Carlsson and Vickers 2015).

1.1.2 Aktuelle Therapiemöglichkeiten

Die Therapie des Prostatakarzinoms umfasst mehrere Strategien und ist abhängig von Alter und Konstitution, dem aktuellen Befund sowie den individuellen Bedürfnissen des Patienten. Generell hängt die Therapie des Prostatakarzinoms davon ab, ob es sich um eine metastasierte oder nicht-metastasierte Entartung von Prostatagewebe handelt. Durch verschiedene UICC-Stadien und die Risikoeinschätzung mit Hilfe mehrerer unterschiedlicher Kriterien wie zum Beispiel Gleason-Score, PSA-Wert, Hormonabhängigkeit, sowie gegebenenfalls R-

Klassifikation und Konstitution des Patienten ergeben sich individuelle Behandlungsstrategien, gerade bei dieser Tumorentität. Eine Unterstützung der Vorbeugung oder Therapie jedes Patienten in jedem Stadium im Sinne einer Primär- bis Quartärprävention ist wünschenswert und scheint gerade bei Prostatakrebs möglich, weshalb diese Arbeit einen Beitrag dazu leisten soll.

1.1.2.1 Therapie des nicht-metastasierten Prostatakarzinoms

(Deutsche Krebsgesellschaft 2019, Mai)

Liegen keine Fernmetastasen vor, stehen zwei gleichberechtigte, kurative Therapieoptionen zur Verfügung. Zum einen die radikale Prostatektomie, die häufig in Kombination mit einer Lymphadenektomie durchgeführt wird. Sind die Lymphknoten befallen oder kann der Tumor operativ nur R1-, statt R0-resiziert werden erfolgt eine zusätzliche Bestrahlung des Tumorbettes. Alternativ besteht die Möglichkeit der Bestrahlung mit 74-80 Gray kombiniert mit einer Hormontherapie. Es handelt sich um eine Androgendeprivation, einen Entzug der männlichen Sexualhormone, hauptsächlich des Testosterons, die das Wachstum der Prostatakarzinomzellen ab einem Übergang in ein hormonsensitives Stadium begünstigen (Nelson 2007). Die chemische Kastration mit GnRH-Analoga oder GnRH-Blocker ist gängige Praxis. Alternativ kann eine beidseitige Orchiektomie als operative Möglichkeit der Kastration durchgeführt werden. Die Art der Therapie wird nach den Präferenzen des Patienten und dem Risikoprofil nach D'Amico ausgewählt (D'Amico, Whittington et al. 1998). Bei einem niedrigen Risikoprofil haben sich die speziellen Behandlungsoptionen „Active Surveillance“ und die LRD-Brachytherapie, bei der Iod¹²⁵-Seeds implantiert werden um das Tumorgewebe abzutöten, etabliert. „Active Surveillance“ beinhaltet eine gesteigerte Überwachung des Patienten durch engmaschige Untersuchungen zum Re-Staging mit digital-rektaler Untersuchung, PSA-Wert-Kontrollen und einer erneuten Biopsie zunächst nach sechs Monaten. Die Überwachung soll rechtzeitig ein Fortschreiten des Karzinoms erkennen lassen um dann eine kurative Therapie einleiten zu können.

1.1.2.2 Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms

(Deutsche Krebsgesellschaft 2019, Mai)

Bei der metastasierten Form erfolgt eine palliative Therapie, die auch für Patienten mit einer tumorunabhängigen Lebenserwartung von unter zehn Jahren zur Anwendung kommt. Dafür

bestehen zwei Möglichkeiten, das sogenannte „Watchful waiting“ und eine Hormontherapie, die kombiniert mit einer Chemotherapie erfolgen kann. „Watchful waiting“ bedeutet ein Unterlassen der möglicherweise kurativen Therapie zugunsten der Lebensqualität, da der Krebs die Lebenserwartung wahrscheinlich nicht beeinflusst. Die Hormontherapie erfolgt mit GnRH-Analoga oder GnRH-Blocker, eine Kombination mit Antiandrogenen zur vollständigen Hormonblockade ist möglich. Als Chemotherapeutikum findet Docetaxel Anwendung.

1.1.3 Ernährungsspezifische Risikofaktoren

Neben Alter, familiärem Umfeld und physischer Betätigung wird zunehmend die Ernährung als wichtiger Faktor für die Gesundheit in den Mittelpunkt von Untersuchungen gestellt (Chan, Van Blarigan et al. 2014). Diese unterscheidet verschiedene Bevölkerungsgruppen teils erheblich voneinander. Bei Einwanderern in die USA oder Europa konnte, im Vergleich zu ihren Herkunftsländern, eine erhöhte Inzidenz für das Prostatakarzinom nachgewiesen werden (Shimizu, Ross et al. 1991). Dies weist auf umwelt- und ernährungsspezifische Einflüsse hin. Für Prostatakrebs scheint die aktuelle Lebensweise relevant zu sein, da sich die Inzidenzraten der ehemaligen Einwanderer und der ansässigen Bevölkerung nicht unterscheiden. Die Inzidenz für das Prostatakarzinom ist dabei unabhängig vom Alter bei der Einwanderung (Shimizu, Ross et al. 1991). Damit muss ein starker Einfluss der Lebensweise auf die Entstehung eines Prostatakarzinoms angenommen werden.

Es gibt Studien, die für diese Tumorentität keinen signifikanten Zusammenhang in Bezug auf die Ernährung, insbesondere die Aufnahme von Nahrungsfetten, feststellen konnten (Crowe, Key et al. 2008). Immer zahlreicher werden jedoch Studien mit eindeutigen Assoziationen zwischen der Ernährung und der Entstehung eines Prostatakarzinoms. Epidemiologische Untersuchungen haben eine Korrelation, sowohl zwischen der Inzidenz, wie auch der Progression von Prostatakrebs und der Ernährung, insbesondere der Aufnahme von Fettsäuren nachgewiesen (Lin, Aronson et al. 2019). Besonders bedeutend scheint das Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren zu sein, da es signifikant das Risiko für höhergradige Prostatatumoren beeinflusst (Williams, Whitley et al. 2011).

Experimente mit Mäusen belegen einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Fettkonsum im Sinne einer westlichen Ernährung mit 45% Fettanteil an der Gesamtkalorienaufnahme und der Progression von Prostatatumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 10% Fettanteil (Chang, Han et al. 2014). Auch im Vergleich zu einer kohlenhydratreichen Ernährung scheint bei diesen

Säugern die fettreiche Nahrung ein höheres Risiko für Prostatakrebs zu induzieren (Huang, Narita et al. 2012). Es wurden darüber hinaus mehrere Nährstoffkomponenten untersucht, um ihre Wirkung auf das Wachstum von Prostatakarzinomzellen des Menschen zu analysieren. Fettreiche Ernährung durch Fleisch- und/oder Milchaufnahme sind als Risikofaktoren für die Entwicklung des Prostatakarzinoms nachgewiesen worden, während Polyphenole zum Beispiel aus grünem Tee und Tomaten das Wachstum hemmen (Zhu, Wang et al. 2015). Gegenwärtig wird einer ballaststoffreichen pflanzenbasierten Ernährung ein geringeres Krebsrisiko zugeordnet (Bahrami, Movahed et al. 2019). Allerdings induziert eine geringe Fettaufnahme in Zusammenhang mit einem verminderten IGF-1-Spiegel im Serum und einem erhöhten IGFBP-1-Spiegel im Serum ein vermindertes Krebszellwachstum bei LNCaP-Zellen (Ngo, Barnard et al. 2002). Obst, Gemüse und Polyphenole können präventiv wirken, Vitamin- und Selenpräparate haben dagegen keine vorbeugende Wirkung. In höheren Dosen wurde für Vitamin- und Selenpräparate eine schlechtere Prognose ermittelt (Mandair, Rossi et al. 2014). Weitere Studien sind erforderlich, um den genauen Wirkmechanismus von Nahrungsbestandteilen auf die Prostatakarzinomentwicklung zu untersuchen.

1.1.4 Die Bedeutung der Fettsäuren beim Prostatakarzinom

Im Mausmodell wurde die Reduktion von Nahrungsfett von 42% auf 12% der Gesamtkalorienmenge mit einem 27% niedrigeren Risiko für den Übergang einer prostatistischen intraepithelialen Neoplasie in eine invasive Form des Krebses beschrieben (Kobayashi, Barnard et al. 2008).

Eine Reduktion der Gesamtmortalität beim Menschen ist durch einen Ersatz von Kohlenhydraten und tierischen Fetten durch pflanzliche Produkte erreichbar (Richman, Kenfield et al. 2013). Ein besonderes Augenmerk gilt dabei dem Vergleich zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren und im Speziellen dem Verhältnis von Omega-3- zu Omega-6-Fettsäuren. Während mehrfach ungesättigte Fettsäuren das Erkrankungsrisiko senken, lassen laut Bidoli et al. einfach ungesättigte Fettsäuren die Inzidenz steigen (Bidoli, Talamini et al. 2005). Noch spezifischer ist mit den mehrfach ungesättigten Omega-3-Fettsäuren eine Unterdrückung des Tumorwachstums möglich, während die mehrfach ungesättigten Omega-6-Fettsäuren die Prostatakrebsentstehung fördern (Williams, Whitley et al. 2011). In einer Phase II-Studie mit Männern, die sich einer radikalen Prostatektomie unterzogen, wurde der Einfluss

einer Verringerung des Nahrungsfettes analysiert. Die Daten belegen eine Korrelation zwischen dem verringerten Verhältnis von Omega-6 zu Omega-3-Fettsäuren und einem reduzierten Verhältnis von gut- zu bösartigem Prostatagewebe (Aronson, Kobayashi et al. 2011).

Für genauere Untersuchungen der Auswirkungen von freien Fettsäuren auf Prostatakarzinomzellen wurden spezielle Ansätze entwickelt. Unterschieden werden diätetische Maßnahmen und ihre Auswirkungen, Serumlevel einzelner Fettsäuren sowie der Gehalt von bestimmten Fettsäuren im Zielgewebe, speziell in den Prostatakarzinomzellen. Bei den diätetischen Maßnahmen sind die Ergebnisse widersprüchlich. Während einige Studien die Aufnahme von Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure mit einem geringeren Risiko für ein fortgeschrittenes Karzinom verbinden und der Alpha-Linolensäure-Aufnahme ein höheres Risiko zuordnen, konnten andere keine Assoziation nachweisen (Park, Murphy et al. 2007). Eine große prospektive Studie über die Aufnahme verschiedener Fettarten und dem daraus resultierenden Risiko der Entstehung von Prostatakrebs in einer Kohorte, ließ keinen Zusammenhang von Ernährungsdaten, bezüglich gesättigter oder einfach ungesättigter Fettsäuren, und der Inzidenz von Prostatakarzinomen erkennen. Eine Interpretation war auf Grund der Datenlage im Hinblick speziell auf Wirkung von Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure allerdings nicht möglich (Wallström, Bjartell et al. 2007). Eine hohe Alpha-Linolensäure-Aufnahme könnte laut Chua et al. wiederum das Prostatakrebsrisiko senken (Chua, Sio et al. 2012), ein Einfluss auf das prostataspezifische Antigen im Blut wurde diesbezüglich nicht belegt (Brouwer, Geleijnse et al. 2013). Bei Untersuchungen der Serumfettwerte ergeben sich andere Resultate. Ein hoher Spiegel an Docosapentaensäure bedeutet ein niedriges Gesamtrisiko für Prostatakrebs. Die zumeist in Fischöl überdurchschnittlich vertretenen Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure erhöhen möglicherweise die Inzidenz höhergradiger Tumoren (Chua, Sio et al. 2013). Die widersprüchlichen Ergebnisse und die unterschiedlichen Herangehensweisen eröffnen eine Vielfalt von Ansätzen, um der individuellen Lösung für jeden Patienten in seiner Lebenssituation und mit seinem Krankheitsstand gerecht werden zu können, aber auch, um allgemeine Empfehlungen weiter untermauern oder verwerfen zu können.

1.2 Cardiolipin

1.2.1 Das Molekül

Cardiolipin (CL) ist ein Phospholipid, das sich fast ausschließlich in der inneren Mitochondrienmembran befindet, wo es auch synthetisiert wird. Die Struktur des Moleküls weicht von der anderer Phospholipide ab, was bedeutend für seine Funktionen ist. Es handelt sich um ein Dimer, das aus zwei über eine Glycerolbrücke verbundene Phosphatidylgruppen besteht, die mit vier Fettsäuren verestert sind. Die unterschiedlichen CL-Spezies ergeben sich aus den Kompositionen der Fettsäureketten, die gleich oder verschieden innerhalb eines Moleküls sein können. In unterschiedlichen Geweben sind spezifische Spezies nachgewiesen worden (Choi, Yin et al. 2018).

1.2.2 Die Synthese

Die Synthese von CL ist in zwei Abschnitte gegliedert. Dabei entsteht zunächst das Molekül CL, was im Anschluss beim sogenannten Remodeling strukturell modifiziert wird.

1.2.2.1 Biosynthese von Cardiolipin

Die Biosynthese des CL findet in vier Schritten an der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran statt. Durch CDP-Diacylglycerol-Synthase entsteht im ersten Schritt aus Phosphatidsäure und Cytidintriphosphat CDP-Diacylglycerol. Im zweiten Schritt wird die Phosphatidylgruppe des CDP-Diacylglycerols auf die sn-1-Hydroxylgruppe von Glycerol-3-Phosphat übertragen. Dabei entsteht Phosphatidylglycerophosphat. Im Anschluss wird dessen terminale Phosphatgruppe durch PGP-Phosphatase abgespalten. Im letzten Schritt entsteht aus dem Produkt Phosphatidylglycerol mit einem weiteren CDP-Diacylglycerolmolekül durch die Cardiolipin-Synthase CL. Schematisch ist der Vorgang in Abbildung 1 dargestellt (Ren, Phoon et al. 2014). Die Anpassung des Moleküls durch das nachfolgende Remodeling bedingt seine Funktionalität und die Spezifität für jedes Gewebe.

1.2.2.2 Remodeling

Beim Remodeling, der postsynthetischen Modifikation, erhält das CL-Molekül Fettsäuren, die organismus- und gewebespezifisch sind. Untersuchungen legen nahe, dass der strukturelle

Umbau durch Tafazzin katalysiert wird. Tafazzin ist ein Enzym, das Fettsäuren von Phospholipiden auf Lysophospholipide übertragen kann. Wie dabei für bestimmte Gewebe spezifische molekulare Muster entstehen ist noch nicht hinreichend geklärt (Schlame and Greenberg 2017). Die Modifikation beginnt mit der MLCL-Bildung durch Abspaltung einer der vier Acylgruppen. Bei Säugetieren erfolgt dies durch die calciumunabhängige Phospholipase A2. Die Reacetylierung wird durch drei Enzyme vermittelt: Monolyso-Cardiolipin-Acyltransferase, Acyl-CoA:lysocardiolipin-Acyltransferase und Tafazzin. Die spezifischen Funktionen der ersten beiden sind noch nicht zufriedenstellend erforscht. Tafazzin ist für eine normale Zusammensetzung und Konzentration von CL unabdingbar. Es ist nachgewiesenermaßen ein Bestandteil des mitochondrialen Intermembranraums und ist dort mit Multiproteinkomplexen assoziiert. Um welche Proteine es sich dabei handelt, wie sie mit Tafazzin interagieren und wie sich das auf die Funktion des Enzyms auswirkt ist noch nicht erforscht (Shilovsky, Zverkov et al. 2019).

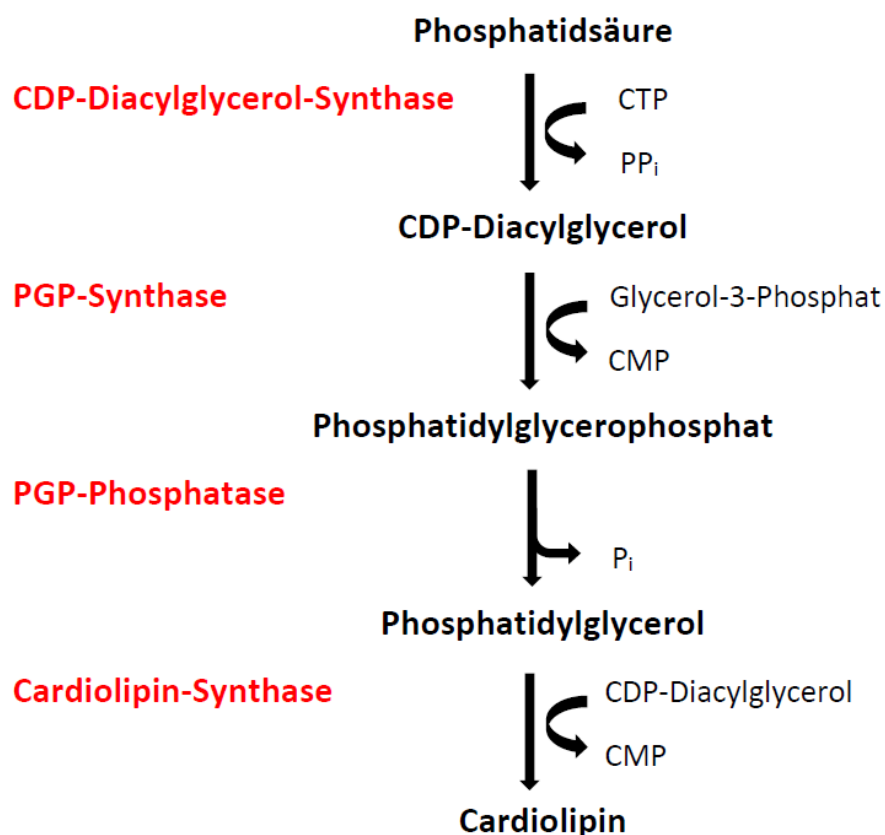


Abbildung 1: Cardiolipinsynthese schematisch nach Ren et al. (Ren, Phoon et al. 2014)

1.2.3 Die Funktionen des Cardiolipins

Die bereits erforschten Funktionen von CL sind vielfältig. CL ist in der inneren Mitochondrienmembran an der Bildung des Elektronengradienten beteiligt durch Interaktion mit den Komplexen der Atmungskette (Paradies, Paradies et al. 2014) bis hin zur Bildung von Superkomplexen (Bogdanov, Mileykovskaya et al. 2008). Weiterhin ist es beteiligt an der Reaktion der Mitochondrien auf oxidativen Stress (Mulikjanian, Shalaeva et al. 2018), an der Apoptose (Schlattner, Tokarska-Schlattner et al. 2015) und der Mitophagie (Chu, Bayir et al. 2014). Es ist Teil der Immunantworten durch die Interaktion mit anderen Zellorganellen über extrazelluläre Signalwege durch die Bildung von Lipidmediatoren im Bereich der Blut-Hirn-Schranke, zum Beispiel nach einer Ischämie (Ji, Baart et al. 2015). Es wird als Pro-Fusions-Lipid bezüglich der Fusion von Mitochondrien angesehen und führt bei Mangel zu fragmentierten, nicht funktionstüchtigen Mitochondrien (Joshi, Thompson et al. 2012).

1.2.4 Cardiolipin und Krebs

Es gibt Hinweise darauf, dass Veränderungen in der Zusammensetzung und Verteilung der molekularen CL-Spezies mit einer Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung einhergehen (Claypool and Koehler 2012, Schild, Lendeckel et al. 2012). Nach der von Warburg postulierten Hypothese der mitochondrialen Dysfunktion in Tumorzellen (WARBURG 1956) ist davon auszugehen, dass CL-vermittelte Veränderungen der oxidativen Phosphorylierung für die Tumorentstehung und -progression wesentlich sein können. Forschungen belegen, dass freie Fettsäuren die Proliferation von Tumorzellen verändern (Hardy, El-Assaad et al. 2003). Sowohl stimulierende, wie auch inhibierende Effekte wurden beobachtet (Murray, Hraiki et al. 2015). Der Metabolismus unterscheidet sich für schnell- und langsam-proliferierende Krebszellen voneinander. Um den Anforderungen des Zellwachstums gerecht zu werden, sind Zellen mit hoher Proliferationsrate auf die Etablierung eines anabolen Metabolismus angewiesen, der durch die glykolytische ATP-Produktion unterstützt wird (Ponisoyskiy 2011). Niedrig oder nicht proliferierende Zellen hingegen beziehen ihre Energie aus der oxidativen Phosphorylierung. In ihrer Arbeit haben Hardy et al. auch über Fettsäure-induzierte Veränderungen im mitochondrialen Phospholipid CL berichtet (Hardy, El-Assaad et al. 2003). Die vorliegenden

Daten lassen jedoch keine Rückschlüsse auf einen Kausal-zusammenhang zwischen CL-Zusammensetzung und Zellproliferation zu. Laut Schild et al. zeigt sich jedoch ein Zusammenhang zwischen der Acylketten-zusammensetzung von CL und der Zellproliferation in Lymphozyten von Patienten mit akuter und chronischer Leukämie sowie in einer Seax-Tumorzelllinie (Schild, Lendeckel et al. 2012). Diese Untersuchung ergab, dass schnell wachsende Lymphozyten durch eine geringe Anzahl von Doppelbindungen innerhalb der CL-Acylkettenreste, einen hohen Gehalt an Palmitinsäure-(C16:0)-Acylkettenresten und geringe Mengen an Stearinsäure-(C18:0)-Acylkettenresten im Vergleich zu niedrig proliferierenden Lymphozyten gekennzeichnet sind. Für die de novo Synthese von CL werden Fettsäuren benötigt. Sie werden als Fettsäurereste in das Molekül eingebaut. Auf diese Weise kann die Versorgung der Zellen mit bestimmten Fettsäuren die Zusammensetzung und Verteilung der molekularen CL-Spezies beeinflussen. Damit ist es möglich die These, dass die CL-Zusammensetzung die Proliferation beeinflusst, durch Änderung des Fettsäuremilieus in Zellkulturen zu überprüfen.

1.3 Zielstellung

Ziel der Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Proliferation von PC-3-Zellen und der molekularen Zusammensetzung des CLs in einem Tumorzellmodell zu untersuchen.

Dazu wurden in der Arbeit folgende Teilziele bearbeitet:

- Kultivierung von PC-3 Zellen über 72 Stunden in Kulturmedien, die zusätzlich verschiedene Fettsäuren enthielten.
- Analyse der Zellproliferation durch Messen des Proteingehaltes und der MTT-Reduktion.
- Lipidomanalyse des CLs mit Bestimmung des zellulären CL-Gehalts, des Sättigungsgrades der Fettsäurereste, des Oxidationsgrades der Fettsäurereste, der molekularen Zusammensetzung des CLs durch die Charakterisierung der Fettsäurereste und der Verteilung der molekularen CL-Spezies.

Auf der Basis der Daten sollte eine Korrelation zwischen der CL-Zusammensetzung und der Zellproliferation untersucht werden. Schließlich sollte der Bezug zum Einfluss des Fettsäuremilieus auf die Proliferation durch Korrelationsanalysen hergestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Diese Arbeit basierte ausschließlich auf *in vitro* -Versuchen. Die Kulturen der PC-3-Prostatakarzinomzellen wurden mit Fettsäuren behandelt und die Zellproliferation analysiert. Als Kontrollen wurden Kulturen mit Staurosporin als Inhibitor der Proliferation (Negativkontrolle) und Methanol als Lösungsmittelkontrolle verwendet. Die zur Vorbereitung auf die Messungen verwendeten Substanzen wurden sowohl in den Proben, als auch in den Kontrollen angewendet. Somit konnte der direkte Vergleich zwischen behandelten Kulturen und Kontrollkulturen, zur Darstellung der Wirkung von Fettsäuren auf Prostatakarzinomzellen, erfolgen.

2.2 Prostatakarzinomzellen

Die Zellen der Linie PC-3 (CRL-1435) sind Zellen eines Adenokarzinoms der Prostata. Sie wurden in flüssigem Stickstoff gelagert bei -196°C von der Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Deutschland) bezogen.

2.2.1 Kultivierung der Prostatakarzinomzellen

Die Kultivierung von 5×10^6 Zellen erfolgte in 75cm²/250ml-Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich) in RPMI-Medium, bei einer Temperatur von 37°C und einer 5%igen CO₂-Konzentration im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland). Zunächst wurden sie in einem 37°C warmen Wasserbad (Altmann Analytik GmbH & Co. KG, München, Deutschland) aufgetaut und in ein 15ml Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich) mit 5ml RPMI-Medium überführt. Die anschließende Zentrifugation (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) erfolgte bei 2000g für 5min. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 3ml RPMI-Medium resuspendiert und zu gleichen Teilen auf drei 75cm²/250ml-Zellkulturflaschen mit je 15ml RPMI-Medium aufgeteilt. Nach fünf Tagen waren die Zellen überwiegend als adhärente Kolonien unter dem Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) erkennbar und das Medium wurde gewechselt. Dazu wurde das alte Medium mit der Pipette (Eppendorf, Hamburg,

Deutschland) abgesaugt, die Zellkulturflasche jeweils mit 2ml PBS gespült, um nur die lebendigen adhärenen Zellen zu erhalten und anschließend 15ml neues RPMI-Medium hinzugegeben. Nach 48h ist dieser Wechsel wiederholt worden. Weitere 48h später waren die Flaschenböden vollständig bewachsen und es konnte die erste Zellpassage erfolgen.

Material: PC-3 (CRL-1435) (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland), RPMI 1640 + L-Glutamin mit 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (alle Reagenzien von PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)

2.2.2 Vermehrung der Prostatakarzinomzellen und Zellpassage

Nach insgesamt neun Tagen wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen durch Abkippen entfernt und der Flaschenboden mit 5ml 37°C warmer PBS gespült. Da die Zellen adhären wachen, mussten die Kulturen mit 37°C warmer Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und über 5min im Brutschrank bei 37°C abgelöst werden. Mit der Pipette wurden die abgelösten Zellen in 15ml Zentrifugenröhrchen mit je 5ml RPMI-Medium überführt und vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit 2000g für 5min. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2ml RPMI-Medium gelöst und konnte wieder zu gleichen Teilen in diesmal zwei Zellkulturflaschen eingebracht werden. Somit ergaben sich sechs Kulturen mit Prostatakarzinomzellen.

Für die erste Passage wurden die Zellen gezählt. Dazu wurden 100µl Zellsuspensat vor der Zentrifugation aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen und in ein Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit 1ml RPMI-Medium überführt. Diese Anteile wurden vorsichtig durchmischt und dann mit je 10µl des Inhalts eine Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) beidseitig befüllt. Die Ermittlung der Zellzahlen erfolgte durch die Auszählung der Zellen in den vier Eckquadranten unter dem Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung. Im Anschluss wurde der Mittelwert aus den Zählergebnissen der vier Quadranten gebildet.

Jeweils rund $3,22 \times 10^6$ Zellen wurden hälftig in neue Zellkulturflaschen überführt und mit 15ml RPMI-Medium aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte die weitere Inkubation für 48h bei 37°C und 5% CO₂, dann folgten weitere vier Passagen in oben aufgeführter Weise, bevor die Zellen der fünften Passage, mit denen die Experimente durchgeführt wurden, in flüssigem Stickstoff konserviert wurden.

Material: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Trypsin/EDTA-Lösung (0,5/0,2%ig), RPMI 1640 + L-Glutamin mit 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin (alle Reagenzien von PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)

2.2.3 Einfrieren der fünften Passage PC-3 (CRL-1435)

Zum Konservieren der kultivierten Zellen wurde flüssiger Stickstoff (-196°C) verwendet. Das Medium wurde abgegossen und die Zellkulturflaschen mit 5ml PBS gespült. Mit 2ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt kamen die Zellkulturflaschen zum Ablösen der Zellen für 5min bei 37°C in den Brutschrank. Aus einer Verdünnung erfolgte die Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer durch Auszählung aller neun Quadranten unter dem Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung. Die Suspension wurde in Zentrifugenröhrchen mit 5ml RPMI-Medium gemischt und anschließend bei 2000g für 5min zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Mediums wurden die Zellen mit 0,2ml Einfriermedium pro eine Millionen Zellen resuspendiert und bei -80°C in Kryoröhrchen (Simport, Bernard-Pilon, Kanada) im Einfriercontainer (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), gefüllt mit 250ml Isopropanol, gelagert um 24h später in flüssigem Stickstoff (-196°C) konserviert zu werden.

Material: flüssiger Stickstoff (AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Trypsin/EDTA-Lösung (0,5/0,2%ig), RPMI 1640 + L-Glutamin mit 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin, Einfriermedium GIBCO 12648-010 (alle Reagenzien von PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

2.2.4 Auftauen der Zellen der fünften Passage und Aussaat in Petrischalen für die Experimente

Zur Rekultivierung der Zellen erfolgte das Auftauen im Wasserbad bei 37°C. Die Zellen wurden mit 5ml RPMI-Medium in 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 2000g für 5min zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2ml RPMI-Medium resuspendiert. Auf zwei Zellkulturflaschen (75cm²/250ml) mit je 15ml RPMI-Medium gleichmäßig verteilt, kamen die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ zum Wachsen in den Brutschrank.

Innerhalb von sieben Tagen wurde zweimal ein Medienwechsel durchgeführt und bei gut bewachsenen Flaschenböden erfolgte die Überführung in Petrischalen ($\varnothing=3,5\text{cm}$). Dazu wurde das Medium abgegossen und die Flasche mit warmem sterilem PBS gespült um nur die lebendigen adhärenen Zellen zu erfassen. Mit 2ml Trypsin/EDTA-Lösung wurden diese über 5min bei 37°C im Brutschrank gelöst, mittels einer Pipette in 5ml RPMI-Medium resuspendiert und in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die unterschiedliche Anzahl der Zellen in den Zentrifugenröhrchen der einzelnen Versuchsreihen führte zu unterschiedlichen Mengen an Zellsuspensat. Mit einer Verdünnung von 1:11 erfolgte die Zählung aus 100 μl Zellsuspensat mit 1ml RPMI-Medium in der Neubauer-Zählkammer bei zehnfacher Vergrößerung unter dem Mikroskop. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspensat wurde wie folgt ermittelt:

$$\frac{a\text{-Zellen} \times 10^4 \mu\text{l}^{-1} \times 11}{9} = b\text{-Zellen} / \mu\text{l}$$

Dabei entspricht:

- a : Zellzahl nach Auszählung der Zählkammer
- $10^4 \mu\text{l}^{-1}$: Faktor der sich aus den Abmessungen der Zählkammer ergibt
- 11 : Verdünnungsfaktor
- 9 : Anzahl der ausgezählten Quadranten
- b : Zellzahl (pro μl Zellsuspensat)

Die Umrechnung erfolgte auf Zellen pro ml Zellsuspensat:

$$b\text{-Zellen} / \mu\text{l} \times 10^3 = b\text{-Zellen} / \text{ml}$$

Mit Hilfe der Menge an Zellsuspensat im Zentrifugenröhrchen wurde die Zellzahl pro Zellkulturflasche/Zentrifugenröhrchen ermittelt mit:

$$b\text{-Zellen} / \text{ml} \times c \text{ ml} = d\text{-Zellen}$$

Dabei entspricht:

- c : Volumen des Zellsuspensats eines Zentrifugenröhrchens
- d : Zellzahl im Zentrifugenröhrchen

Für jedes Experiment wurden 128 Petrischalen für die Messungen benötigt, mit jeweils 2ml Lösung und darin enthaltenen circa 200.000 Zellen, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Aufgrund der ermittelten Zellzahl konnte mit einer festen Menge von 300ml RPMI-Medium die entsprechende Menge an Zellsuspensat hinzugefügt werden, um eine möglichst konstante Aussaat mit jeweils circa 200.000 Zellen in 2ml warmem RPMI-Medium in die Petrischalen sicherzustellen.

$$\frac{300\text{ml} \times 0,2 \times 10^6 \text{ Zellen}}{d\text{-Zellen}} = e \text{ ml}$$

Dabei entspricht

d : Zellzahl im Zentrifugenröhrchen

e : benötigtes Volumen des Zellsuspensats aus dem Zentrifugenröhrchen

Pro 2ml des Gemisches aus Zellsuspensat und RPMI-Medium konnten dadurch circa 200.000 Zellen je Petrischale ausgesät und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Experimente untereinander gewährleistet werden.

Material: RPMI 1640 + L-Glutamin mit 10% FCS +1% Penicillin/Streptomycin, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Trypsin/EDTA-Lösung (0,5/0,2%ig) (alle Reagenzien von PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)

2.2.5 Applikation von Zusätzen zu den PC-3-Zellen

Nach 24h wurden die Petrischalen mit 20µl der jeweiligen Fettsäure, 20µl Methanol oder 4µl Staurosporin beimpft. Die in Methanol gelösten Fettsäuren hatten in den Stammlösungen eine Konzentration von 5mM, woraus sich im Ansatz von 2ml RPMI-Medium mit den PC-3-Zellen in der Petrischale und 20µl Fettsäurelösung eine 50µM Endkonzentration ergibt. Die Durchführung erfolgte mit den Fettsäuren Linolsäure, Stearinsäure, Arachidonsäure, Ölsäure, Palmitinsäure und Docosahexaensäure. Vier Stunden und 72 Stunden nach Applikation der Zusätze wurden Proben für die Analyse von Proteingehalt, MTT-Reduktionsfähigkeit und CL-Bestimmung entnommen. In Abbildung 2 ist schematisch die Organisation der Zellkultivierung und Experimente dargestellt.

Material: Fettsäuren, Staurosporin, Methanol (alle Reagenzien von Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim am Albuch, Deutschland), RPMI 1640 + L-Glutamin mit 10% FCS +1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)

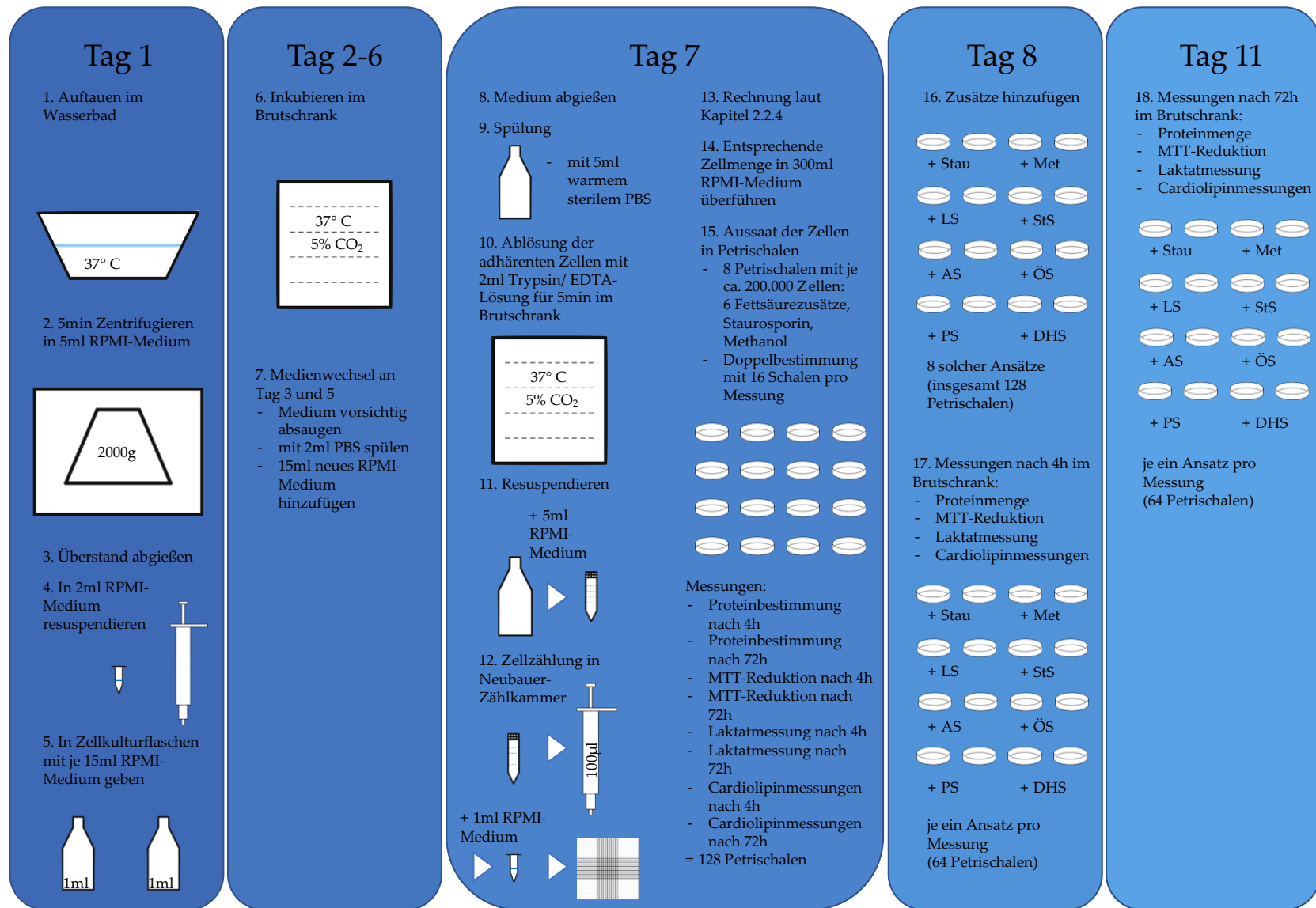


Abbildung 2: Arbeitsschritte eines Experimentes

2.3 Analysen

2.3.1 Proteinextraktion und spektrophotometrische Bestimmung des Proteingehalts

Die Messungen erfolgten 4h und 72h nach Hinzufügen des jeweiligen Zusatzes in Doppelbestimmung (Abbildung 2). Das Medium wurde mit Hilfe eines Vakuumsabsaugsystems (Ditabis, Pforzheim, Deutschland) abgesaugt und die Petrischalen zweimal mit 2,5ml kaltem PBS gespült, um nur die lebendigen adhären Zellen zu erfassen. Nach Zusatz von 500µl 1%iger SDS/0,1M NaOH wurden die Zellen abgeschabt und die entstandene Zellsuspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Für 5min erfolgte zur Denaturierung die Lagerung bei 95°C im Wasserbad. Nach kurzem Vortexen (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) und Zentrifugieren als quick run bis 10.000U/min (Heraeus, Hanau, Deutschland) wurden 20µl der Probe in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Es wurden 20µl Rinderserumalbumin als Standard und 20µl 1%ige SDS/0,1M NaOH zugefügt, ebenso 1ml aus einer Lösung 50:1 aus 0,1MNaOH/2%Na₂CO₃/0,1%SDS und 0,5%CuSO₄x 5H₂O/1%Natriumcitrat. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden 100µl Folin-Reagenz hinzugefügt und nach kurzem Vortexen folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 30min. Die spektrophotometrische Messung der Absorption erfolgte mit dem Cary 50 BIO™ (Varian, Darmstadt, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 700nm. Dafür wurde der Inhalt des Mikroreaktionsgefäßes nach kurzem Vortexen direkt vor der Messung in eine Polystyrol-Küvette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Die Eichkurve wurde mit BSA als Proteinstandard erstellt (LOWRY, ROSEBROUGH et al. 1951). Die quantitative Bestimmung des Proteingehalts gelang durch die gemessenen optischen Dichten im Vergleich zur Standardkurve. Der Leerwert wurde Null gesetzt und mit 20µl Aqua dest. ermittelt.

Material: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PAA Laboratories GmbH, C²lbe, Deutschland), 1%ige Natriumdodecylsulphatlösung/ 0,1M Natronlauge, Albumin Bovine Fraktion V (BSA, 2% Natriumcarbonat, 0,5% Kupfersulfat/ Wasser/1%Natriumcitrat, Folin-Reagent, Aqua dest. (alle Reagenzien von Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim am Albuch, Deutschland)

2.3.2 Bestimmung der MTT-Reduktion

Die Reduktion von MTT spiegelt den Anteil der vitalen Zellen in den Kulturen wider, da nur diese metabolische Aktivität aufweisen. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid wird zu violetter Formazan reduziert, das im Anschluss bei 570nm photometrisch gemessen wird. Die Messungen erfolgten 4h und 72h nach Hinzufügen des jeweiligen Zusatzes (Abbildung 2) in Doppelbestimmung. Die Zellen wurden in 2ml RPMI-Medium mit 0,15mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) bei 37°C und 5% CO₂ für 30min im Brutschrank inkubiert (Musser and Oseroff 1994). MTT wurde dabei in einer Lösung mit 6mg MTT/ml PBS hinzugefügt. Das Medium wurde abgesaugt, 1ml DMSO-Gemisch hinzugegeben und nach kurzem Mischen alles in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Das DMSO-Gemisch enthielt 0,1M NaOH, um nicht durch etwaige pH-abhängige Veränderungen bei der Absorption den Bezug zur Proteinbestimmung zu verfälschen. Die Messung erfolgte mit dem Cary 50 BIO™ bei einer Wellenlänge von 570nm. Nach kurzem Vortexen des Mikroreaktionsgefäßes wurde der Inhalt in eine Polystyrol-Küvette überführt. Zur Bestimmung des Leerwerts diente ein Reaktionsgemisch mit 1ml DMSO.

Material: RPMI 1640 + L-Glutamin mit 10% FCS +1% Penicillin/ Streptomycin, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), DMSO-Gemisch (250ml Dimethylsulfoxid + 2,5ml 0,1M NaOH) (Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim am Albuch, Deutschland)

2.3.3 Bestimmung der Laktatkonzentration

Aus jedem Ansatz wurde 1ml Zellsuspension für die Bestimmung des Laktatgehalts verwendet. Die Messung erfolgte nach 4h und 72h (Abbildung 2) nach Herstelleranleitung in Doppelbestimmung mit dem Cobas 6000 c 501 Analysesystem (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Alle Reagenzien stammten von der Roche Diagnostics GmbH in Mannheim.

2.3.4 Cardiolipinbestimmung

Lipidextraktion: Zu 10µl der Proben wurden 50ng Tetra-myristoyl-CL als interner Standard hinzugefügt. Um die Lipide einschließlich CL zu extrahieren, wurden die Proben mit 4,2ml Chloroform/Methanol (2/1, v/v) mit 0,05% BHT versetzt. Die fett- und wasserlöslichen Phasen wurden nach Zugabe von 800µl 0,01M HCL durch intensives Schütteln und Zentrifugieren getrennt. Die untere fettlösliche Phase wurde abgenommen, mit Stickstoff getrocknet und angesäuert. 2ml eisgekühltes Methanol, 1ml Chloroform und 1ml 0,1M HCL wurden hinzugesetzt und die Komponenten intensiv gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5min auf Eis wurden die Phasen erneut durch die Zugabe von 1ml Chloroform und 1ml 0,1M HCL getrennt. Die Chloroform/Methanol-Phase ist CL-haltig. Wieder erfolgte die Trocknung mit Stickstoff, dann das Lösen in Chloroform/Methanol/Wasser (50/45/5, v/v/v). Nach dem Vermischen und Filtern über eine 0,2µm PTFE-Membran (Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim am Albuch, Deutschland) konnten die Proben analysiert werden.

HPLC-MS/MS Analyse: Die Messung der molekularen Zusammensetzung des CLs erfolgte mit dem TSQ Quantum Discovery Max (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) mit negativer Elektrosprayionisation. Das HPLC System besteht aus einer schmalen quaternären Surveyor MS Pumpe mit integriertem Vakuumentgaser und einem Surveyor Auto Sampler. Die Temperatur wurde im Autosampler auf 8°C eingestellt. Die in Chloroform/Methanol/Wasser (50/45/5, v/v/v) gelösten Proben wurden in das HPLC-System injiziert und durch eine LiChroCart-Säule (125mm x 2mm), LiChrosper Si60 (5µm Partikeldurchmesser; Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie einen variablen Gradienten zwischen Lösung A (Chloroform) und Lösung B (Methanol/Wasser 9:1, v/v) aufgetrennt. Alle Lösungen enthielten 25% Ammoniak (0.1ml/l). Der Gradient betrug: 0-0,2min 92% Lösung A, 8% Lösung B; 0,2-4,5min 92-30% Lösung A, 8-70% Lösung B; 4,5-6min 30% Lösung A, 70% Lösung B; 6-6,5min 30-92% Lösung A, 70-8% Lösung B; 6,5-11min 92% Lösung A, 8% Lösung B. Die Durchflussrate lag bei 300µl/min. Die gesamte Analysezeit lag bei 11min. Das Eluat wurde zwischen 0,3min und 6min ins Massenspektrometer eingebracht. Zur Vernebelung wurde Stickstoff verwendet. Als Kollisionsgas diente Argon bei einem Druck von 1,5mTorr. Die Sprayspannung lag bei 3,5kV. Die Temperatur der Kapillare der Ionenquelle wurde auf 375°C festgelegt und die Kegelspannung betrug 30V. Durch eine Kollisionsenergie von 36eV ergaben sich Tochterfragmente, abgeleitet von den doppelt geladenen Elternfragmenten von (C18:2)₄-CL mit m/z 723,6 ((M-2H)²⁻/2). Diese molekularen CL-Arten und der interne Standard (m/z 619,6),

ihre zweifach geladenen Ionen und die jeweiligen Fettsäuren Linolsäure m/z 279,2 und Myristinsäure m/z 227,2 wurden per „mass transfer reaction monitoring“ unter Verwendung des „selected reaction monitoring mode“ (SRM) analysiert. Dieselbe Vorgehensweise wurde für die anderen CL-Arten verwendet. Die Menge der molekular unterschiedlichen Arten von CL wurden auf den Gehalt von $(C18:2)_4CL$ bezogen. Oxidiertes CL $[(C18:2)_3\text{monohydroxylinolsäure-CL}]$ konnte im SRM-Modus als Umwandlung von m/z 731.6 in m/z 279.2 (Linolsäure) gemessen werden.

Material: Tetra-myristoyl-Cardiolipin $[(C14:0)_4]$ (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Alabama, Vereinigte Staaten von Amerika), Chloroform/Methanol (2/1)/0,05% Butylhydroxytoluol, Salzsäure (Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim am Albuch, Deutschland), flüssiger Stickstoff (AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland)

2.4 Statistische Analyse

2.4.1 Allgemeine Angaben zur Statistik

Die Studie beruht auf insgesamt acht separaten Zellkulturen, in denen alle Untersuchungen mit den Fettsäuren Linol-, Stearin-, Arachidon-, Öl-, Palmitin- und Docosahexaensäure, sowie der Lösungsmittelkontrolle Methanol und der Negativkontrolle Staurosporin durchgeführt wurden. Eine Ausnahme besteht in der Bestimmung der Laktatkonzentration, hierfür wurden zur Orientierung nur zwei Zellkulturen verwendet. Alle dargestellten Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Für die Auswertung relevant war jeweils der Vergleich einer Probe zur Lösungsmittelkontrolle. Die statistische Analyse der erhobenen Daten erfolgte daher als Zweistichproben- t -Test. Das Signifikanzniveau lag bei p -Werten $< 0,05$. Detailliertere Angaben zu p -Wert und Signifikanzen finden sich bei den jeweiligen Abbildungen.

2.4.2 Pearson-Korrelationskoeffizient und Bestimmtheitsmaß

Bestimmt werden sollte, ob die Zusammensetzung des CLs direkten Einfluss auf die Proliferation der PC-3-Zellen hat. Der Zusammenhang zwischen der Menge an angebotenen Fettsäuren, die nach 72h Kultivierung in das CL-Molekül eingebaut wurden und der MTT-Reduktionsfähigkeit, unter dem Einfluss derselben Fettsäuren, wurde rechnerisch hergestellt.

Dazu diente der Korrelationskoeffizient nach Pearson:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

Dabei sind:

- r : Pearson-Korrelationskoeffizient
- x : Werte des Gehalts an einer bestimmten Fettsäure im CL-Molekül
- $\bar{x}$: Mittelwert aus den x -Werten
- y : Werte der MTT-Reduktionsfähigkeit derselben Fettsäure
- $\bar{y}$: Mittelwert aus den y -Werten

Zur besseren Darstellung erfolgte die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes als r^2 .

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Fettsäuren auf das Wachstum der PC-3-Prostatakarzinomzellen

3.1.1 Proteingehalt

Um das Wachstum der PC-3-Zellen unter Zugabe der verschiedenen Fettsäuren beurteilen zu können, erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts (Zellprotein). Die Bezugsgröße ist die Lösungsmittelkontrolle mit Methanol, die Negativkontrolle mit Staurosporin als Apoptoseinduktor durch Caspase-3-Aktivierung. Die Auswirkungen der Zugaben wurden anhand der Proteinmenge 4h und 72h nach Zugabe der Zusätze gemessen.

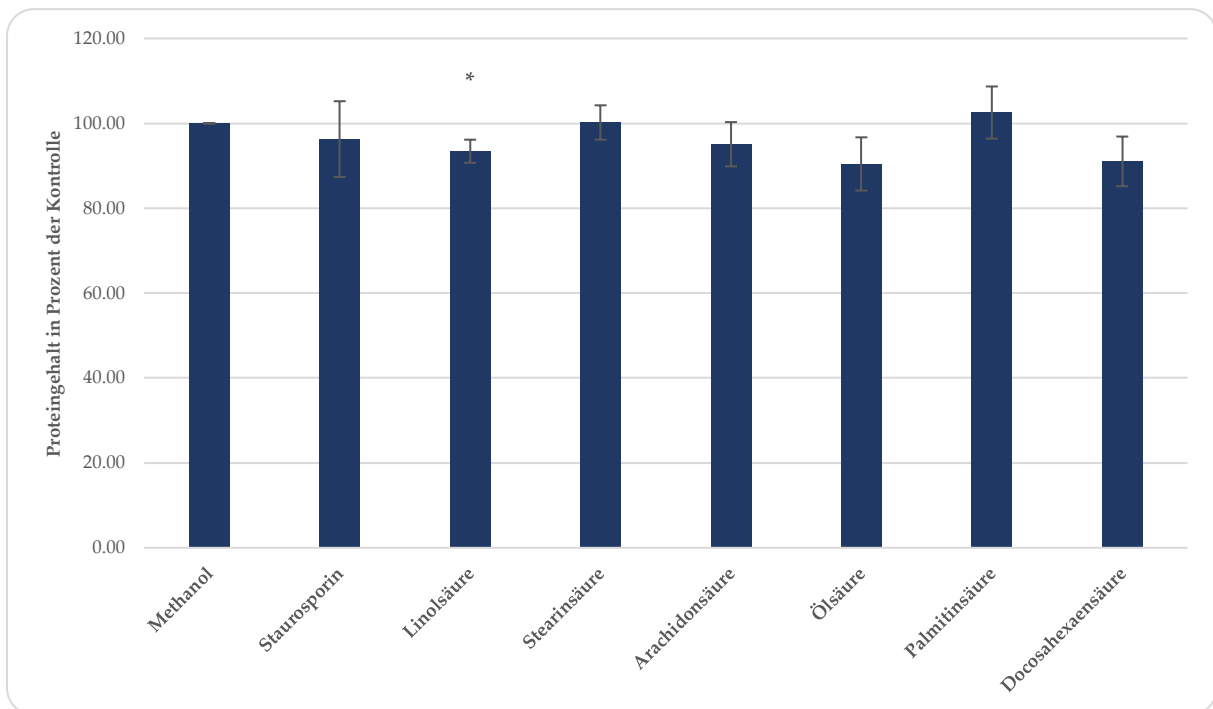


Abbildung 3: Proteingehalt der Proben nach 4h

Die spektrophotometrische Messung der Absorption zur Ermittlung des Proteingehalts erfolgte mit einer Wellenlänge von 700nm, 4h nach dem Hinzufügen des jeweiligen Zusatzes. Die Säulen repräsentieren den relativen Proteingehalt (prozentual) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle Methanol. Signifikant stellt sich mit 7% der Abfall des Proteingehaltes bereits für den Zusatz von Linolsäure dar. Bei Stearin- und Palmitinsäurezugabe verhalten sich die Prostatakarzinomzellen ähnlich wie die Kontrolle (100-102%). Dargestellt sind die Mittelwerte und ihr Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t -Test. $p < 0,05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.005$ (***); $p < 0.001$ (****)

Wie in Abbildung 3 dargestellt, zeigte sich innerhalb von 4h eine geringere Proteinmenge bei Linolsäure, Ölsäure und Docosahexaensäure im Vergleich zur Kontrolle. Signifikant ist dieser Effekt nach dieser kurzen Zeit nur unter Linolsäure. Mit Stearinsäure verhalten sich die PC-3-Zellen wie die Lösungsmittelkontrolle, unter Palmitinsäureeinfluss scheinen sie vermehrt zu wachsen (nicht signifikant). Nach 72h Inkubation mit weiterer Vermehrung und dem Wachstum der Prostatakarzinomzellen unter den entsprechenden Zusätzen lässt sich für Staurosporin ein signifikant geringerer Proteingehalt im Vergleich zur Kontrolle nachweisen. Während sich die Prostatakarzinomzellen unter Palmitinsäure ähnlich der Lösungsmittelkontrolle verhalten, fällt auch unter Linol-, Stearin-, Arachidon- und Docosahexaensäure eine signifikant verminderte Proteinbildung auf, wie in Abbildung 4 dargestellt. Die Proteinmenge ist vor allem durch die Proliferation der Zellen geprägt. Durch sie kann aber keine Aussage über die Ursache für eine Verringerung der Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle gemacht werden. Diese kann zum einen in einer Hemmung des Wachstums, im Sinne einer Verlangsamung, oder aber in der ausbleibenden Proliferation nach apoptotischem Absterben der Zellen liegen.

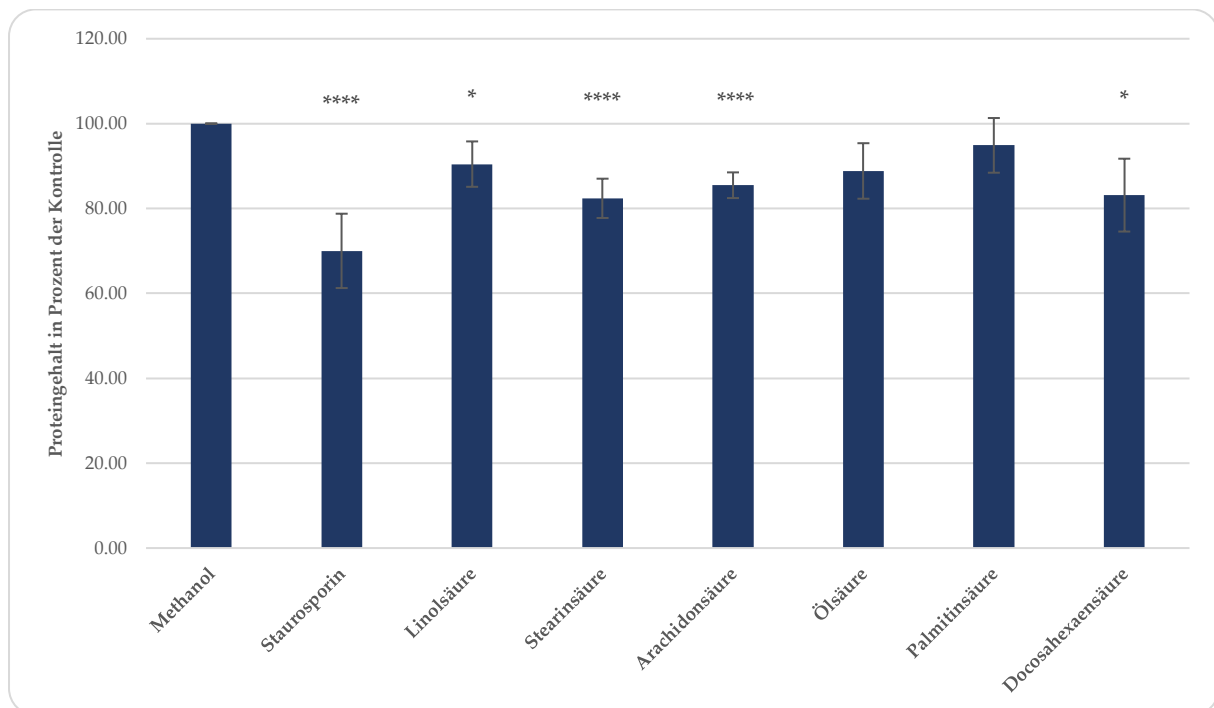
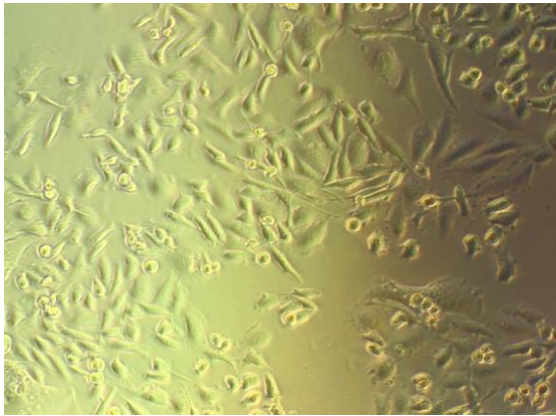


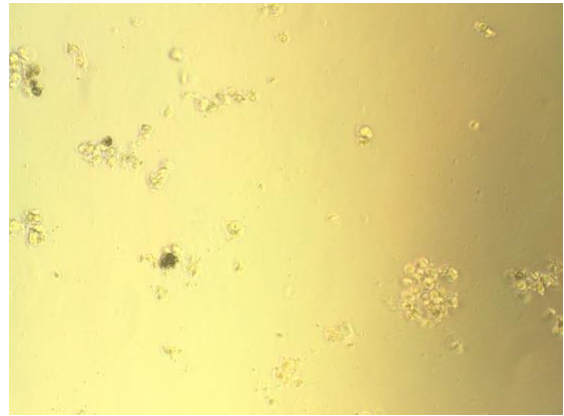
Abbildung 4: Proteingehalt der Proben nach 72h

Die spektrophotometrische Messung der Absorption zur Ermittlung des Proteingehalts erfolgte mit einer Wellenlänge von 700nm, 72h nach dem Hinzufügen des jeweiligen Zusatzes. Die Säulen repräsentieren den relativen Proteingehalt (prozentual) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle Methanol. Ein signifikanter Abfall des Proteingehaltes im Vergleich zur Kontrolle von 10-18% konnte für die Kultivierung mit den Zusätzen Linol- (10%), Arachidon- (15%), Docosahexaen- (17%) und Stearinsäure (18%) festgestellt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte und ihr Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *t*-Test. $p < 0,05(*)$; $p < 0.01(**)$; $p < 0.005(***)$; $p < 0.001(****)$

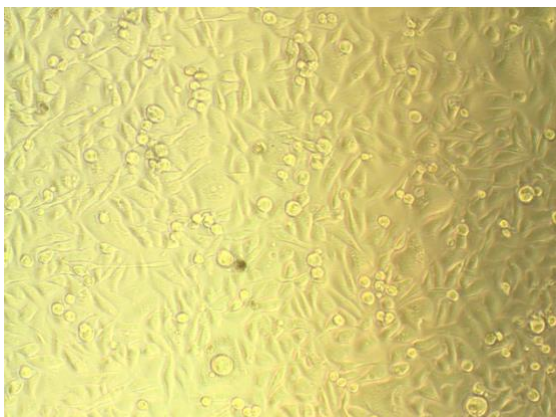
Das Wachstum der Zellen konnte auch fotografisch festgehalten werden, dargestellt sind die Fotodokumentationen in der Abbildung 5. Es sind Aufnahmen der Petrischalen mit 2ml Inhalt nach 72h Kultivierung unter dem Mikroskop. Sie zeigen die spindelförmigen Prostatakarzinomzellen. Die einzelnen Zellschichten überlagern sich bei zunehmender Zelldichte. Die Zellen in der Methanolkontrolle und die mit Palmitinsäure als Zusatz haben gut ausgeprägte Zellfortsätze. Dagegen scheinen diese bei Stearinsäurezusatz geringer ausgeprägt. Die fotografische Aufnahme unter Staurosporinzusatz lässt zerstörte Zellen erkennen, was zur Apoptoseinformation bei diesem Zusatz passt. Die Zugabe von Fettsäuren beeinflusst die Zellmorphologie. Die Ergebnisse scheinen mit der Proliferation zu korrelieren. Da sich die Bilder der anderen Zellkulturen unter den verbliebenen Zusätzen ähneln, ist zur besseren Abgrenzbarkeit auf die Darstellung aller Fotografien verzichtet worden. Beispielhaft zeigen die vorhandenen Abbildungen die größten Unterschiede ausreichend auf.



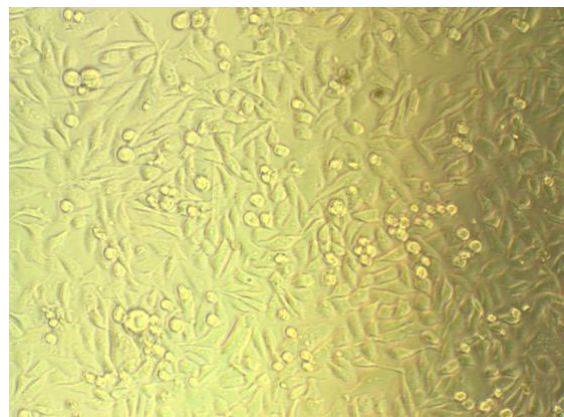
a) Methanol



b) Staurosporin



c) Stearinsäure



d) Palmitinsäure

Abbildung 5: Mikroskopisch-fotografische Aufnahmen der Prostatakarzinomzellen nach 72h Inkubation

Dargestellt sind die PC-3-Zellen unter Einfluss der oben mit a-d bezeichneten jeweiligen Zusätze nach 72h Kultivierung. Bei der Negativkontrolle Staurosporin zeigt sich Zellschutt, die apoptotische Wirkung ist optisch durch die zerstörten Zellen sichtbar. Unter Stearinsäureeinfluss scheinen die Zellfortsätze geringer ausgeprägt als bei der Methanolkontrolle und unter Palmitinsäurezusatz. Die beiden Letzteren zeigen gut ausgeprägte Zellfortsätze. Es ist zu erkennen, dass die hinzugefügten Fettsäuren das Wachstum der Prostatakarzinomzellen beeinflussen können, möglicherweise steht dies in Zusammenhang mit der veränderten Zellmorphologie.

3.1.2 MTT-Reduktion

Die Reduktion von MTT spiegelt den Anteil der vitalen Zellen in den Kulturen wider, da nur diese metabolische Aktivität aufweisen. Die MTT-Reduktion verhält sich dabei proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen. Für die Messungen nach 4h sind signifikante Ergebnisse im Sinne einer verminderten metabolischen Aktivität durch die Zugabe von Linolsäure und Arachidonsäure, wie in Abbildung 6 dargestellt, ersichtlich. Eine Verminderung ohne statistische Relevanz zeigt sich für die Zusätze Stearin-, Öl- und Palmitinsäure. Die Zugabe von Docosahexaensäure scheint mit einer Steigerung der metabolischen Aktivität einher zu gehen, die jedoch nicht im signifikanten Ausmaß liegt.

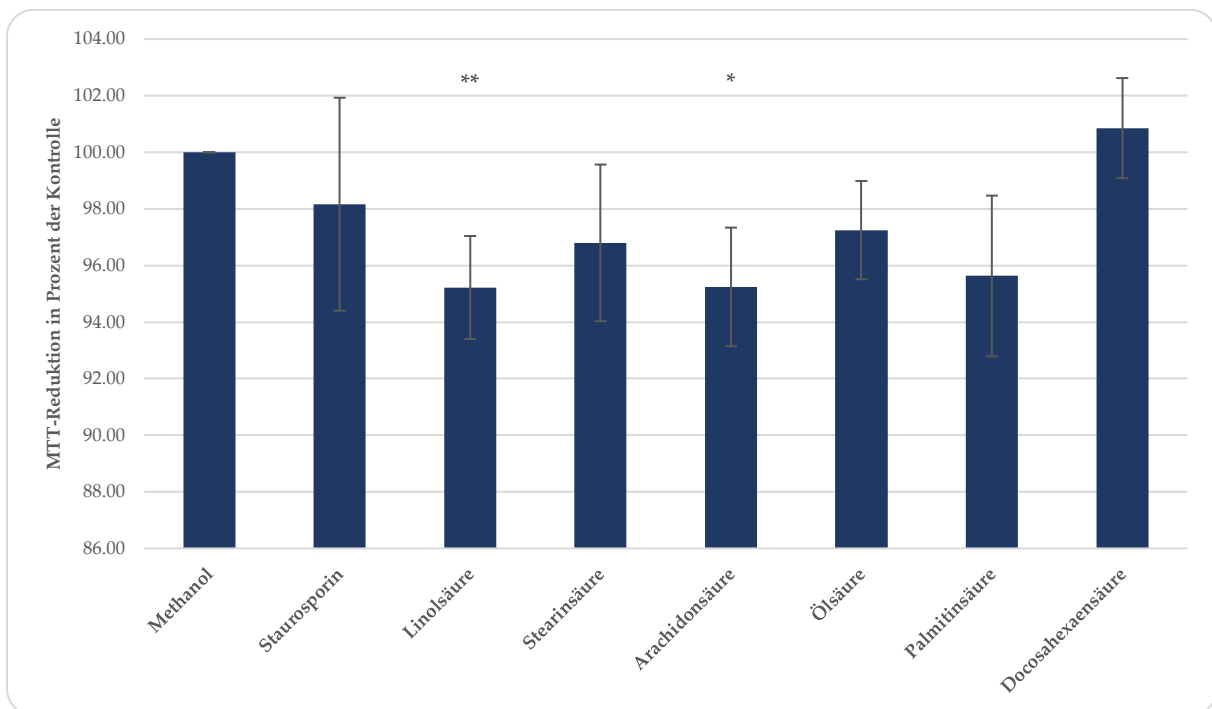


Abbildung 6: MTT-Reduktion nach 4h

Die spektrophotometrische Messung der Absorption für die MTT-Reduktionsbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 570nm, 4h nach dem Hinzufügen des jeweiligen Zusatzes. Die Säulen repräsentieren die relative Fähigkeit der PC-3-Zellen MTT zu reduzieren (prozentual) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle Methanol. Signifikante Ergebnisse lassen sich bei den Zusätzen Linol- und Arachidonsäure erkennen (95%). Die metabolische Aktivität ist bei beiden vermindert gegenüber der Lösungsmittelkontrolle Methanol. Docosahexaensäure zeigt eine vergleichbare Wirkung auf die

metabolische Aktivität der Zellen (101%). Dargestellt sind die Mittelwerte und ihr Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t -Test. $p < 0,05(*)$; $p < 0.01(**)$; $p < 0.005(***)$; $p < 0.001(****)$

Die MTT-Reduktionsmessung ergab nach 72h nur für Palmitinsäure eine erhöhte metabolische Aktivität im Vergleich zu Methanol (105%), jedoch ohne Signifikanz. Signifikant gesenkt war die Aktivität bei der Negativkontrolle Staurosporin, wie auch für die Fettsäuren Linol-, Stearin-, Arachidon- und Ölsäure. Unter Einwirkung dieser Fettsäuren konnte die metabolische Aktivität der Prostatakarzinomzellen bei Ölsäure um 25% gesenkt werden. Bei Linol- und Arachidonsäure bewirkte es eine 20%ige Minderung, bei Stearinsäure waren es immerhin 10%. Die Abbildung 7 spiegelt diese Messungen wider.

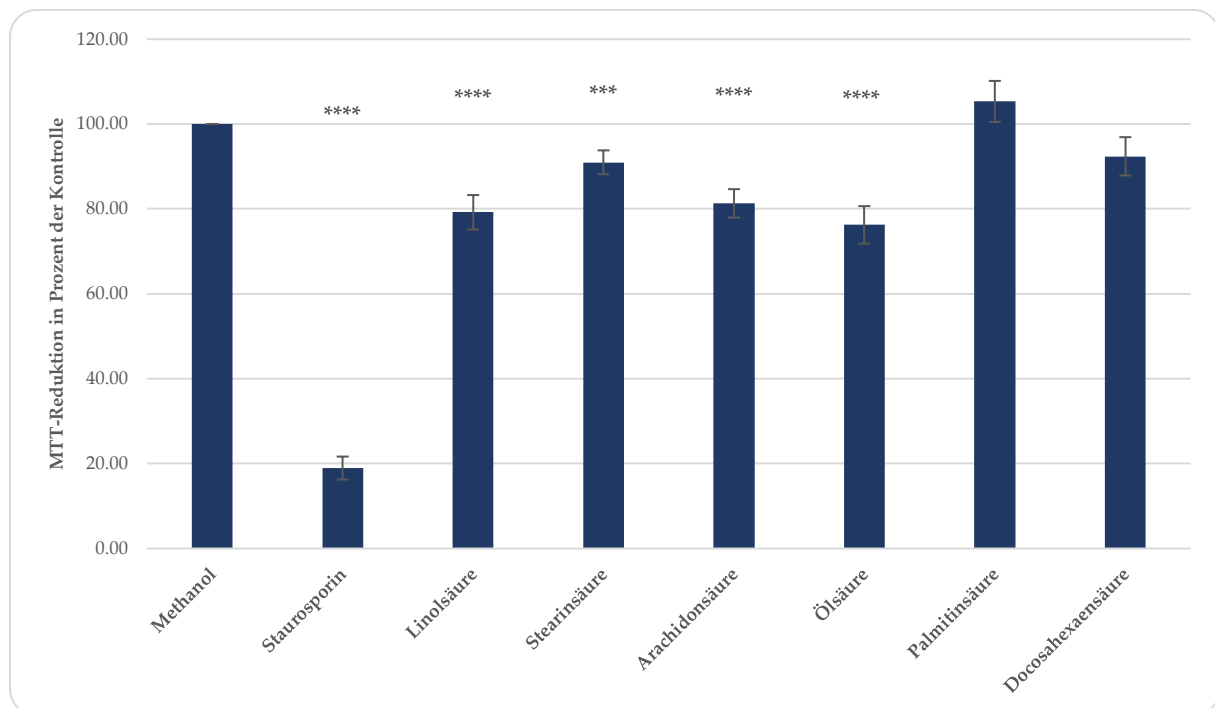


Abbildung 7: MTT-Reduktion nach 72h

Die spektrophotometrische Messung der Absorption für die MTT-Reduktionsbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 570nm, 72h nach dem Hinzufügen des jeweiligen Zusatzes. Die Säulen repräsentieren die relative Fähigkeit der PC-3-Zellen MTT zu reduzieren (prozentual) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle Methanol. Statistisch signifikante Verminderungen der metabolischen Aktivität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle Methanol lassen sich für die Zusätze Stearin- (9%), Arachidon- (19%), Linol- (21%) und Ölsäure (24%) nachweisen. Dargestellt sind die Mittelwerte und ihr Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t -Test. $p < 0,05(*)$; $p < 0.01(**)$; $p < 0.005(***)$; $p < 0.001(****)$

3.1.3 MTT/Protein

Die Menge des reduzierten MTT hängt sowohl von der metabolischen Aktivität (Redoxkraft) der Zellen als auch von der Zellzahl ab. Die Bildung des Quotienten aus der Menge des reduzierten MTT und der Zellproteinmenge ist deshalb ein Parameter für die zelluläre metabolischen Aktivität (spezifische Aktivität). Bei den Experimenten zeigte sich eine signifikante Verminderung der spezifischen metabolischen Aktivität der Prostatakarzinomzellen für die Negativkontrolle Staurosporin auf 28% der Kontrolle und unter dem Zusatz von Linolsäure auf 89%.

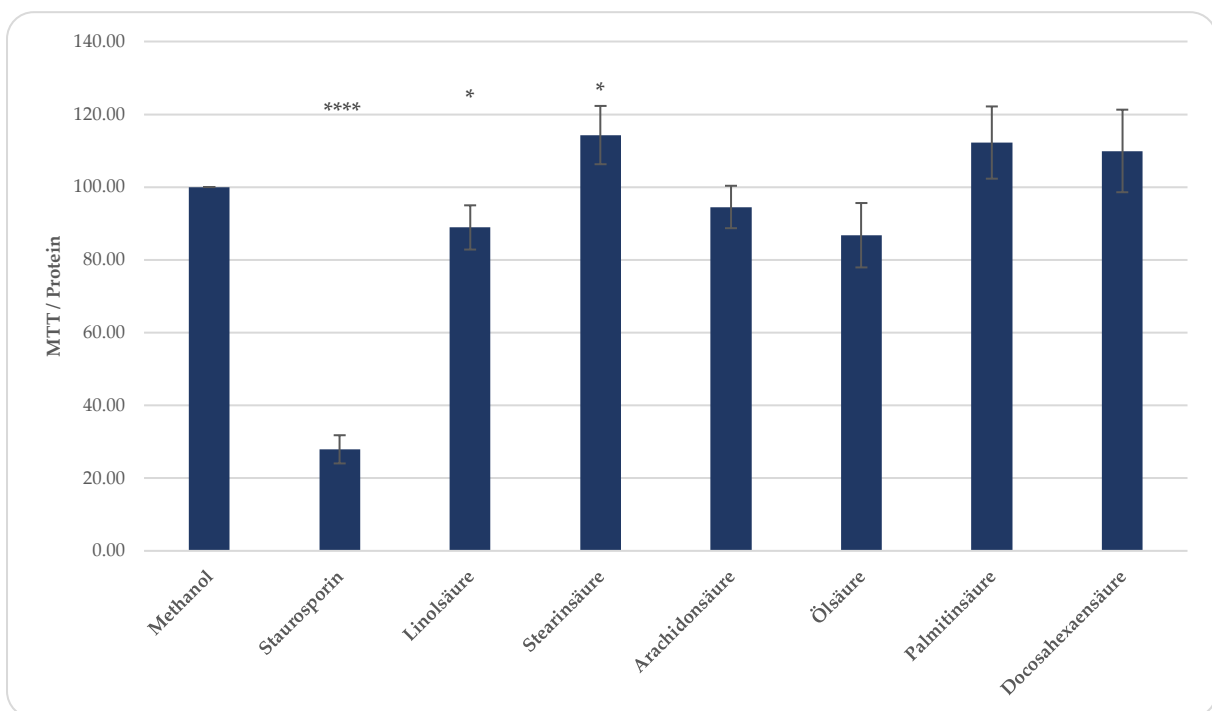


Abbildung 8: MTT-Reduktion / Protein nach 72h

Die Ergebnisse der spektrophotometrischen Messungen der Absorption bezüglich Proteingehalt und MTT-Reduktion wurden durch die Bildung des Quotienten in Beziehung zueinander gesetzt. Eine Steigerung oder Verminderung der metabolischen Aktivität durch den jeweiligen Zusatz ist pro Proteinmenge direkt vergleichbar. Die Säulen repräsentieren diesen Quotienten (prozentual) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle Methanol. Eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität je Proteinmenge lässt sich dabei mit 89% für Linolsäure ablesen. Stearinsäureeinfluss lässt diesen Quotienten auf 114% der Kontrolle steigen, was einer signifikanten Erhöhung der metabolischen Aktivität je Proteinmenge entspricht. Dargestellt sind die Mittelwerte und ihr Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *t*-Test. $p < 0,05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.005$ (***); $p < 0.001$ (****)

Ebenfalls gemindert war die spezifische Aktivität in Gegenwart von Ölsäure (87%), jedoch auf Grund des statistisch großen Fehlers, ohne Signifikanz. Eine Steigerung der metabolischen Aktivität je Proteinmenge ist bei den PC-3-Zellen unter Zugabe von Stearin- (114%), Palmitin- (112%) und Docosahexaensäure (109%) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle sichtbar. Signifikant ist diese Steigerung bei Stearinsäure. Dargestellt sind die Ergebnisse in Abbildung 8. Am Beispiel der Stearinsäure ist zu erkennen, dass Proteingehalt und die metabolische Aktivität getrennt betrachtet gleichgerichtet antiproliferativ erscheinen, die metabolische Aktivität je Proteinmenge jedoch signifikant gesteigert und damit scheinbar stimulierend auf die Prostatakarzinomzellen wirkt. Vor- , beziehungsweise Nachteile eines Zusatzes bezogen auf die Proliferation der Prostatakarzinomzellen zu beurteilen, resultiert aus einer Entscheidung darüber, welchem Parameter der Vorzug zu gewähren ist. In diesem Fall spielen am ehesten Umbauprozesse eine Rolle, wie sie im weiteren Verlauf der Arbeit erläutert werden. Für die Betrachtung der stimulierenden oder inhibierenden Wirkung auf die Proliferation von PC-3-Zellen wurde im Zuge dieser Überlegungen beschlossen die Menge des reduzierten MTT als Indikationsparameter zu wählen. Der Parameter ist sensitiv und korreliert qualitativ mit dem Zuwachs an Zellprotein. Dadurch wird am ehesten eine reale Abbildung der Wirkung der einzelnen Zusätze auf die Proliferation der Prostatakarzinomzellen erreicht.

3.1.4 Laktatkonzentration

Krebszellen führen laut der Warburg-Hypothese als wesentliches Merkmal ihre Glykolyse mit dem anschließenden anaeroben Schritt der Reduktion von Pyruvat zu Laktat, durch die Lactatdehydrogenase, durch. Das geschieht auch, wenn ausreichend Sauerstoff vorhanden ist. Auf Basis dieser Überlegung wurde in zwei Experimenten die glykolytische Aktivität der Prostatakarzinomzellen unter dem Einfluss der jeweiligen Fettsäure anhand der Messung zellulär gebildeter Laktatmengen ermittelt.

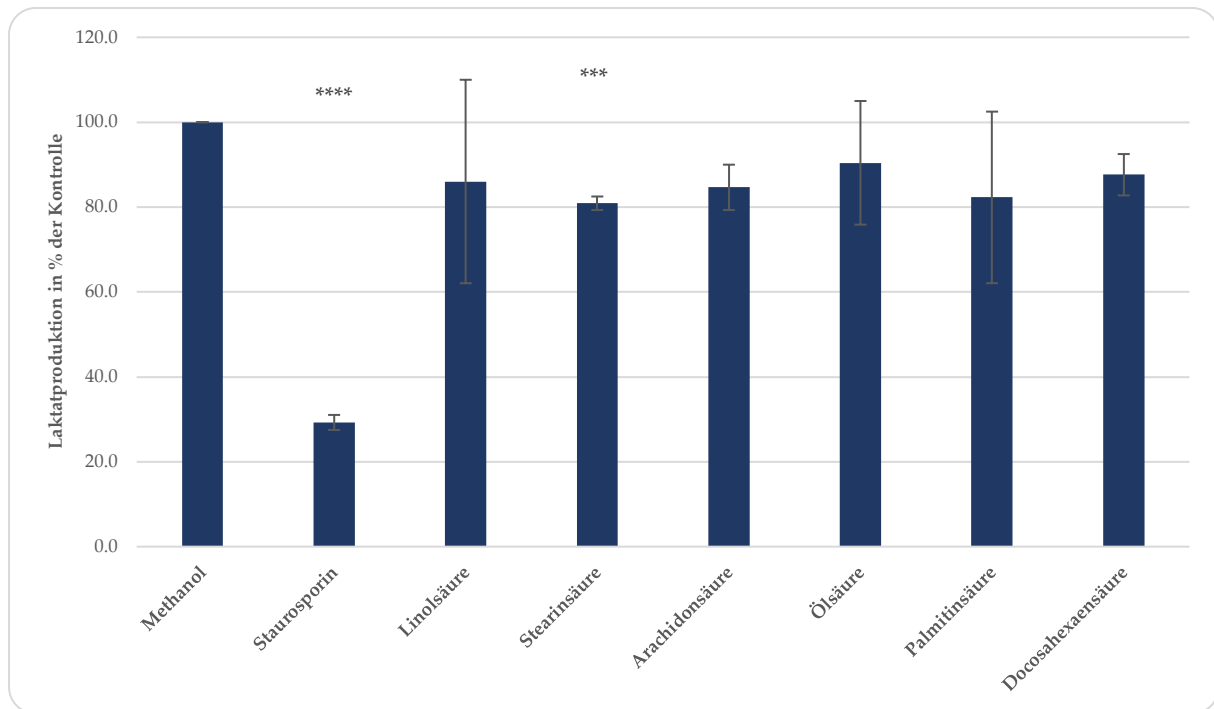


Abbildung 9: Laktatproduktion nach 72h Kultivierung

Aus den Ansätzen wurde 1ml Zellsuspension für die Bestimmung des Laktatgehalts verwendet. Die Säulen repräsentieren die relative zelluläre Laktatproduktion (prozentual) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle Methanol. Statistisch signifikant ist dabei der Zusatz von Stearinsäure zu den PC-3-Zellen. Es zeigt sich eine Verminderung der Laktatproduktion auf 81% im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und ihr Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t -Test. $p < 0,05(*)$; $p < 0.01(**)$; $p < 0.005(***)$; $p < 0.001(****)$

In der Abbildung 9 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Nur für Stearinsäure lässt sich eine signifikant verminderte glykolytische Aktivität nachweisen, in diesem Fall würde die Warburg-Hypothese zutreffen. Dies gilt nicht für die anderen Fettsäuren, die glykolytische Aktivität scheint daher für die Proliferation der Prostatakarzinomzellen nicht dominant bestimmend zu sein.

3.2 Cardiolipin

Um den Zusammenhang zwischen der CL-Zusammensetzung und der Proliferation von PC-3-Zellen zu beurteilen wurden mehrere Analysen durchgeführt. Bestimmt wurden die Verteilung und die Zusammensetzung der molekularen CL-Spezies, der Gesamt-CL-Gehalt und ein Oxidationsprodukt des CL. Die beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf Messungen nach

72h Kultivierung mit Methanol als Lösungsmittelkontrolle, Staurosporin als Negativkontrolle sowie den Fettsäuren Linol-, Stearin-, Arachidon-, Öl-, Palmitin- und Docosahexaensäure, da nach vier Stunden die Effekte nicht stark ausgeprägt waren.

3.2.1 Zusammensetzung und Verteilung der molekularen Cardiolipinspezies

In dieser Arbeit wurde die Verteilung von insgesamt 19 molekularen CL-Spezies analysiert. Es handelte sich dabei um die für die angewandte Methode in ausreichender Menge vorkommenden CL-Spezies. Die ermittelten CL-Daten zeigten einen signifikanten Einfluss des Zusatzes von Fettsäuren auf die Verteilung der molekularen CL-Spezies. In Tabelle 1 ist der Anteil molekularer CL-Spezies in Prozent des Gesamt-CLs angegeben. Es war ein vermehrter Einbau der zugesetzten Fettsäure an allen vier Fettsäureresten festzustellen. 72h nach der Zugabe von Linolsäure wurde im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle eine Erhöhung des relativen Anteils von (C18:2)₄-CL von $2,7 \pm 0,33\%$ auf $33,52 \pm 2,74\%$ beobachtet. Auch beim Angebot der anderen Fettsäuren ist ein vermehrter Einbau dieser in die Acetylkettenreste zu verzeichnen und damit auch signifikante Verminderungen des relativen Anteils anderer CL-Spezies mit davon unterschiedlichen Fettsäuren. Der Anteil von (C18:2)₄-CL liegt mit $1,63 \pm 0,49\%$ bei der Inkubation mit Ölsäure signifikant unter dem der Kontrolle mit $2,7 \pm 0,33\%$. Die freie Fettsäure, die angeboten wird, wird zum Nachteil der ursprünglichen Zusammensetzung der CL-Spezies und deren Verteilung vermehrt eingebaut, weshalb sich die Aufteilung der CL-Spezies zum Vorteil dieser Fettsäure verschiebt. Der relative Anteil der Spezies (C18:2)₃/C20:4-CL steigerte sich auf rund 230% Prozent von $2,69 \pm 2,13\%$ auf $6,15 \pm 4,28\%$ unter dem Zusatz der Arachidonsäure (C20:4). Nach einer Inkubationszeit von 72h mit Docosahexaensäure (C22:6) liegt die Steigerung des relativen Anteils an C22:6/(C18:2)₃-CL im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bei etwas mehr als 500% von $0,27 \pm 0,07\%$ auf $1,36 \pm 0,31\%$.

Insgesamt ist Docosahexaensäure eine zu einem geringen Anteil im CL-Molekül eingebaute Fettsäure. Unter ihrem Einfluss hebt sich keiner der 19 CL-Spezies als prozentual großer Anteil am Gesamt-CL hervor. Auch bei der Stearinsäure kann dies beobachtet werden. Diese Fettsäure wird aufgrund komplexer Interaktionen im Lipidstoffwechsel der Zellen in andere Fettsäuren umgewandelt, weswegen ein Einbau in das CL-Molekül praktisch nicht stattfindet. Bei beiden Fettsäuren, sowohl Stearinsäure, wie auch Docosahexaensäure, vermindert sich der relative Anteil der CL-Spezies (C18:1)₃/(C16:0)₂-CL von einem Hauptanteil, mit $23,49 \pm 2,59\%$ bei der

Lösungsmittelkontrolle, signifikant auf $14,48 \pm 1,89\%$ bei Stearinsäure und $16,52 \pm 2,60\%$ bei Docosahexaensäure. Es erfolgt eine Umverteilung der prozentualen Anteile der einzelnen CL-Spezies ohne erkennbar veränderten Einbau der hinzugesetzten Fettsäure in die CL Moleküle.

3.2.2 Gesamtcardiolipingehalt und Cardiolipin-Oxidation

Auch der Gesamtgehalt an CL wird durch Fettsäuren im Kulturmedium beeinflusst. Die Summe der einzelnen Spezies steigt bei der Zugabe von Linolsäure auf das Vierfache der Kontrolle ($0,59 \pm 0,07$ nmol/mg auf $2,35 \pm 0,22$ nmol/mg) an, während der Gesamt-CL-Gehalt unter dem Einfluss von Arachidonsäure nur noch die Hälfte erreicht ($0,59 \pm 0,07$ nmol/mg zu $0,32 \pm 0,04$ nmol/mg). Abgebildet sind die Ergebnisse in Abbildung 10.

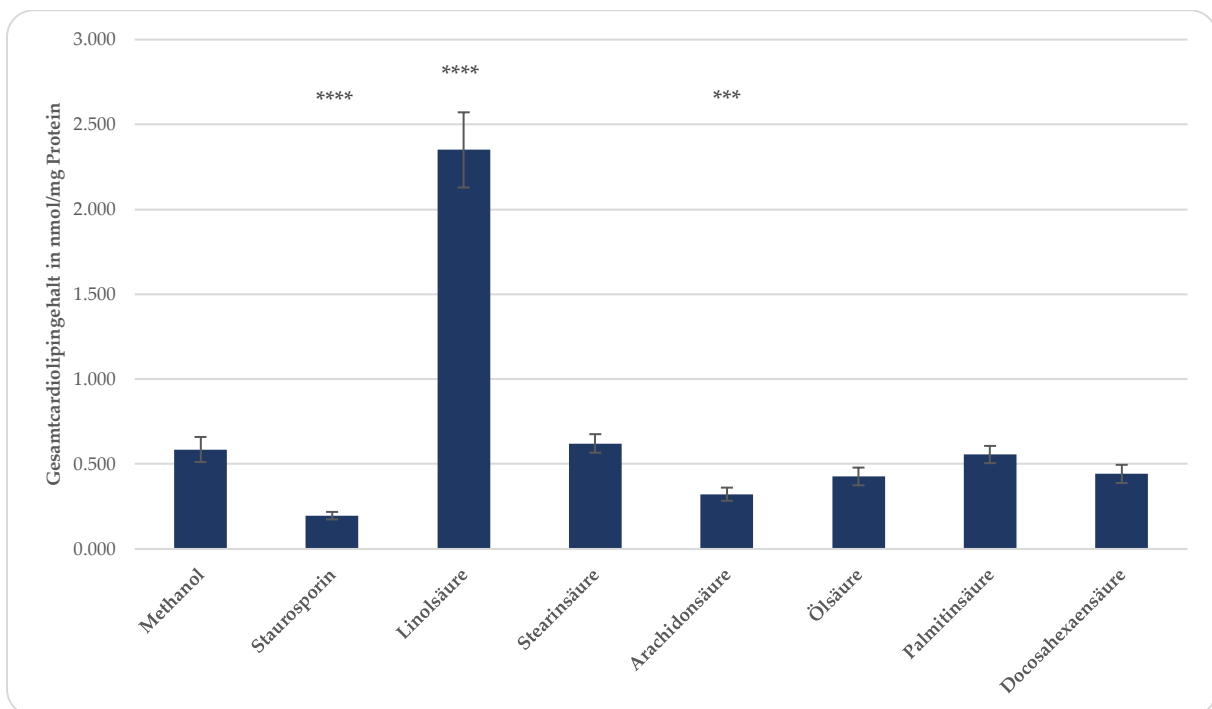


Abbildung 10: Gesamtcardiolipingehalt als Summe der Spezies

Die Bestimmung des Gesamt-CL-Gehaltes in der Zelle erfolgte 72h nach dem Hinzufügen der Zusätze. Die Säulen repräsentieren den Gesamt-CL-Gehalt in nmol/mg Protein für alle Zusätze. Für Linolsäure ist eine Vervielfachung der Gesamtmenge zu verzeichnen die sich wie auch die Halbierung unter Arachidonsäure als Zusatz als statistisch relevant erwies. Dargestellt sind die Mittelwerte und ihr Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *t*-Test. $p < 0,05(*)$; $p < 0,01(**)$; $p < 0,005(***)$; $p < 0,001(****)$

Um zu überprüfen ob der Zusatz von Fettsäuren die Oxidation des CLs beeinflusst, wurde die Menge an (C18:2)₄-CL, bei dem ein Linolsäurerest oxidiert wurde, als Marker genutzt. Entsprechende Daten finden sich in Abbildung 11. Signifikant war der Abfall des oxidierten (C18:2)₄-CLs nach der Zugabe von Linolsäure. Auch bei Palmitinsäure ist diese Tendenz erkennbar, jedoch nicht statistisch signifikant. Bei den anderen Fettsäuren zeigte sich kein signifikanter Effekt. Diese Daten belegen, dass sich je nach Fettsäurezusatz sowohl die CL-Zusammensetzung, als auch der Gesamt-CL-Gehalt und dessen oxidierten Anteil verändern. Die Änderungen scheinen nicht mit der MTT-Reduktion oder der Zellproteinmenge der PC-3-Prostatakarzinomzellen zu korrelieren.

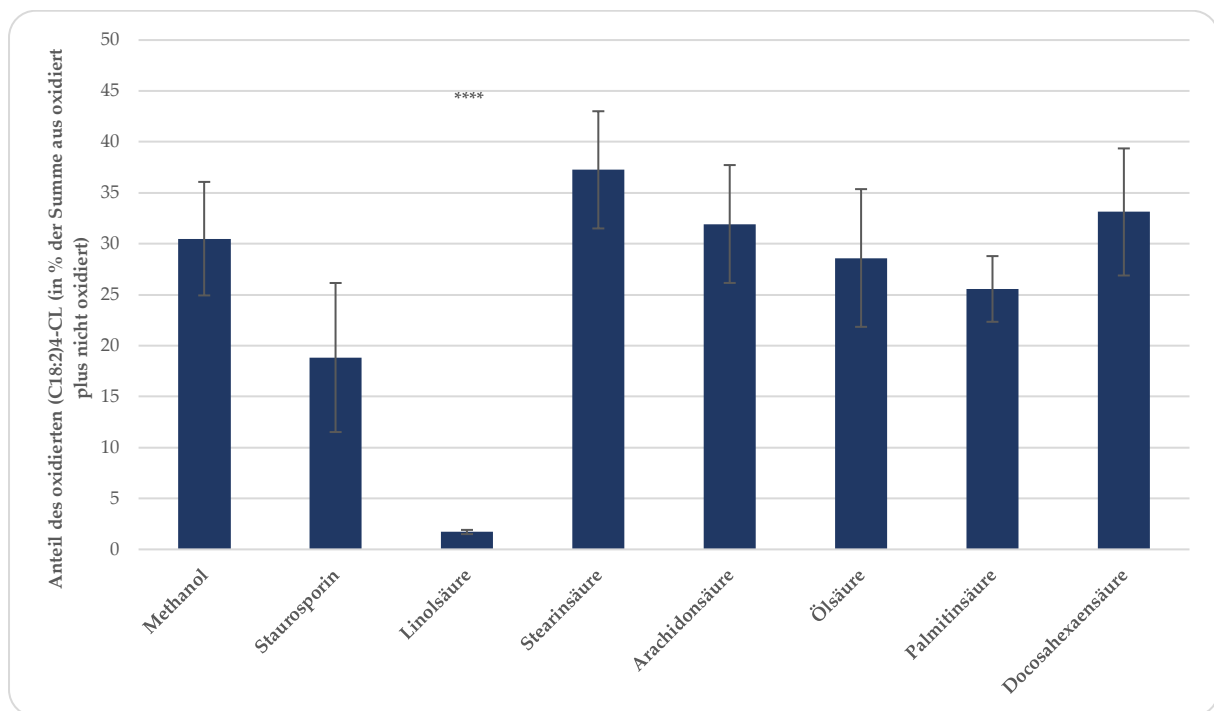


Abbildung 11: oxidierte Anteil des Gesamtcardiolipin in % (C18:2)₄

Die Bestimmung des oxidierten Anteils von (C18:2)₄-CL, in Prozent der Summe aus oxidiertem und nicht oxidiertem CL, erfolgte 72h nach dem Hinzufügen der Zusätze. Die Säulen repräsentieren den prozentualen Anteil des oxidierten (C18:2)₄-CL, in Bezug auf die Summe aus oxidiertem und nicht oxidiertem CL. Statistisch signifikant ist der stark reduzierte, prozentuale Anteil unter Zusatz von Linolsäure. Während bei der Lösungsmittelkontrolle Methanol rund 30% des CLs oxidiert sind, sind es unter Linolsäure noch 2%. Mit 37% lässt sich bei Stearinsäure eine Steigerung des oxidierten Anteils gegenüber der Kontrolle erkennen. Dargestellt sind die Mittelwerte und ihr Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *t*-Test. $p < 0,05(*)$; $p < 0.01(**)$; $p < 0.005(***)$; $p < 0.001(****)$

Die unterschiedlichen Fettsäuren beeinflussen die Proliferation der Zellen, wie in Abbildung 7 dargestellt, in einem Rahmen von 76-105% im Vergleich zur Kontrolle. Um die Frage zu klären, ob die geänderte Proliferation der PC-3-Zellen durch die modifizierte Zusammensetzung des CLs verursacht wurde, wurden die Menge der eingebauten Fettsäurereste in den CL-Molekülen und die MTT-Reduktion jeweils nach 72h Kultivierung aus den CL-Basisdaten berechnet (siehe Kapitel 1.1.1). Jede Fettsäure verändert die Zusammensetzung der CL-Fettsäurereste und hat Einfluss auf die MTT-Reduktion als Parameter für das Wachstum der PC-3-Prostatakarzinomzellen. Ein eindeutiger linearer Zusammenhang wurde nur für Palmitoleinsäure gefunden. Dabei muss bedacht werden, dass diese aus Palmitinsäure synthetisiert wird. Das Bestimmtheitsmaß liegt bei $r^2 = 0,67$ und das Ergebnis ist in Abbildung 12 dargestellt.

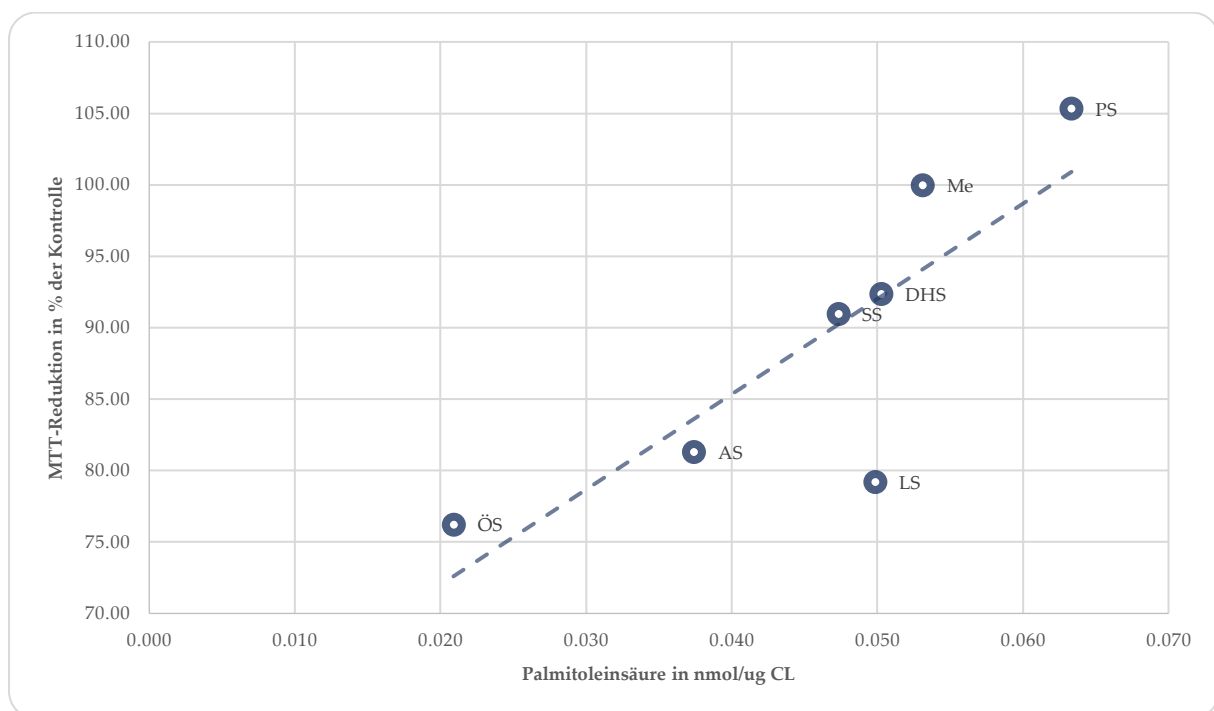


Abbildung 12: Gehalt an Palmitoleinsäure im Verhältnis zur Proliferation der Prostatakarzinomzellen

Nach 72h Inkubation mit den ausgewiesenen Zusätzen (Linolsäure-LS, Stearinsäure-SS, Arachidonsäure-AS, Ölsäure-ÖS, Palmitinsäure-PS, Docosahexaensäure-DHS, Methanol-Me) wurden der Gehalt an Palmitoleinsäure im CL-Molekül und die MTT-Reduktionsfähigkeit der Prostatakarzinomzellen gemessen. Die Daten entstanden aus Messungen von sechs Zellkulturen und sind dargestellt als Mittelwerte und den dazugehörigen Standardfehlern. Für diese Messungen ist ein linearer

Zusammenhang erkennbar. Ein höherer Gehalt an Palmitoleinsäure in den Fettsäureresten des CLs führt zu einer gesteigerten MTT-Reduktion und damit zu einer erhöhten Proliferation der PC-3-Zellen.

Die Lipidanalyse der CL-Zusammensetzung in PC-3-Prostatakarzinomzellen spricht der Palmitoleinsäure eine hohe Relevanz in Bezug auf die Proliferation zu. Wenn diese in den CL-Molekülen auf Grund erhöhter Präsenz vermehrt verbaut wird, hat dies eindeutig einen proliferationsfördernden Effekt.

Zusatz	Methanol			Linolsäure			Stearinsäure			Arachidonsäure			Ölsäure			Palmitinsäure			Docosahexaensäure		
Molekulare CL-Spezies	Gehalt in % des Gesamtcardiolipins																				
(C18:2) ₄ -CL	2,70	±	0,33	33,52	±	2,74*	2,56	±	0,69	4,72	±	0,54*	1,63	±	0,49*	2,49	±	0,28	3,64	±	0,51*
(C18:2) ₃ /C18:1-CL	3,33	±	0,43	20,00	±	3,70*	3,80	±	0,85	4,00	±	0,56	1,04	±	0,22*	3,30	±	0,56	4,25	±	0,65
(C18:2) ₂ /(C18:1) ₂ -CL	7,89	±	0,83	8,59	±	0,35	10,91	±	1,39	5,87	±	0,41*	4,63	±	0,33*	6,48	±	0,56	8,31	±	1,05
C18:2/C18:1/(C16:0) ₂ -CL	1,44	±	0,39	1,18	±	0,36	1,16	±	0,43	1,48	±	0,76	0,73	±	0,51*	1,63	±	0,26	1,61	±	0,69
(C18:1) ₂ /(C16:0) ₂ -CL	23,49	±	2,59	1,25	±	0,39*	14,48	±	1,89*	23,33	±	2,20	19,88	±	4,45	29,88	±	2,87	16,52	±	2,60*
(C18:2) ₃ /C16:1-CL	1,12	±	0,23	4,13	±	0,35*	1,07	±	0,38	1,62	±	0,30	0,48	±	0,31*	1,22	±	0,20	1,54	±	0,39
(C18:2) ₂ /C18:1/C16:1 o. (C18:2) ₃ /C16:0-CL	4,15	±	0,19	4,73	±	0,58	3,79	±	0,42	3,02	±	0,47*	1,87	±	0,49*	4,87	±	0,48	4,23	±	0,42
(C18:1) ₂ /C18:2/C16:1 o. (C18:2) ₂ /C18:1/C16:0-CL	9,22	±	0,76	1,66	±	0,16*	7,99	±	1,18	4,75	±	0,93*	3,33	±	0,84*	11,33	±	1,34	7,48	±	1,12
(C18:1) ₂ /C18:2/C16:0-CL	4,31	±	0,14	1,71	±	0,52*	4,43	±	0,29	2,91	±	0,48*	1,57	±	0,18*	4,70	±	0,39	4,09	±	0,37
(C18:1) ₃ /C16:0-CL	18,89	±	2,24	0,30	±	0,06*	16,80	±	3,85	12,36	±	3,78	42,55	±	2,87*	14,83	±	3,03	13,12	±	2,95
(C18:1) ₂ /(C18:3) ₂ -CL	2,44	±	0,20	0,55	±	0,04*	1,73	±	0,26	4,68	±	1,28*	0,67	±	0,17*	2,40	±	0,27	6,09	±	1,17*
(C18:1) ₃ /C18:2-CL	8,09	±	1,22	2,01	±	0,11*	12,11	±	2,61	5,85	±	1,41	12,83	±	4,03*	5,70	±	0,87	7,37	±	1,37
(C18:2) ₃ /C20:4-CL	2,69	±	2,13	3,72	±	0,69	3,58	±	3,50	6,15	±	4,28*	2,52	±	2,77	2,25	±	1,77	5,20	±	2,99
(C18:2) ₃ /C20:3 o. (C18:2) ₂ /C18:1/C20:4-CL	2,63	±	0,58	5,86	±	0,83*	3,93	±	2,57	4,84	±	2,09	1,17	±	0,88*	1,92	±	0,60	5,04	±	0,98*
(C18:2) ₃ /C20:2 o. (C18:2) ₂ /C18:1/C20:3-CL	3,10	±	0,35	7,01	±	1,03*	4,51	±	1,24	7,67	±	1,05*	1,78	±	0,51*	2,38	±	0,33*	4,52	±	0,41
(C18:2) ₂ /C18:1/C20:2-CL	2,57	±	0,27	2,75	±	0,45	4,64	±	0,80*	4,01	±	0,61*	1,41	±	0,27*	2,24	±	0,25	3,30	±	0,22*
(C18:2) ₃ /C20:0 o. (C18:1) ₂ /C18:2/C20:2-CL	1,58	±	0,65	1,02	±	0,26	2,36	±	0,53	2,70	±	1,66*	1,84	±	1,04	1,42	±	0,76	2,04	±	0,95
C22:6/(C18:2) ₃ -CL	0,27	±	0,07	0,01	±	0,00*	0,10	±	0,07*	0,02	±	0,02*	0,08	±	0,06*	0,67	±	0,35	1,36	±	0,31*
C22:6/(C18:2) ₂ /C18:1-CL	0,07	±	0,03	0,00	±	0,00	0,05	±	0,06	0,02	±	0,02	0,02	±	0,01*	0,28	±	0,16*	0,28	±	0,07*

Tabelle 1: Verteilung der Cardiolipinspezies

Die Bestimmung der CL-Spezies in der Zelle erfolgte 72h nach dem Hinzufügen der Zusätze. (C-Anzahl der Kohlenstoffatome:Anzahl der Doppelbindungen). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *t*-Test, $p < 0,05$ (*).

4 Diskussion

4.1 Ziel der Arbeit, Material und Methoden

Das Ziel dieser Arbeit war, die Zusammenhänge zwischen der Proliferation der Prostatakarzinomzellen und der CL-Zusammensetzung ihrer Mitochondrien *in vitro* zu untersuchen. Durchgeführt wurden die Experimente mit Prostatakarzinomzellen der PC-3-Zelllinie, die, androgen-unabhängig und androgenrezeptor-negativ, ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung widerspiegeln (Stope, Sauermann et al. 2012). Obwohl das Prostatakarzinom eine relativ langsam wachsende Tumorentität darstellt, wurde für die PC-3-Zellen, im Vergleich zu anderen aus dem Pool der Prostatakarzinomzellen, ein vergleichsweise schnelles Wachstum belegt, weshalb sie sich gut für das experimentelle Arbeiten eignen (Romijn, Verkoelen et al. 1988). Üblicherweise wird die Zellproliferation durch die DNA-Syntheserate, die Zellzahl, den Proteingehalt und die MTT-Reduktionsfähigkeit definiert. Der Vorteil der MTT-Reduktionsmessung liegt darin, die metabolische Aktivität der vitalen Zellen erfassen zu können (Kwan, Chao et al. 2015). Für die Experimente wurden die Proteinmessung und die MTT-Reduktionsmessung zur Beurteilung der Entwicklung der Zellkulturen ausgewählt. Beide Parameter, sowohl die Bestimmung des Proteingehaltes, wie auch die MTT-Reduktionsmessungen, konnten das Wachstum und auch den Einfluss der freien Fettsäure im Medium auf die Proliferation abbilden. Die Ergebnisse zeigen deutlich eine Schnittmenge der beiden Parameter, allerdings gibt es auch Unterschiede. Die Abweichungen diesbezüglich lassen auf eine Mischung aus lebendigen, metabolisch aktiven Zellen und einen Anteil toter Zellen schließen, beide werden bei der Proteingehaltmessung berücksichtigt, die Schnittmenge ergibt sich jedoch nur durch die stoffwechselaktiven Zellen, die bei der MTT-Reduktionsmessung erfasst werden. Durch die Bildung des Quotienten aus MTT-Reduktion und Proteingehalt sollte am ehesten ersichtlich sein, welche Fettsäure stimulierende oder inhibierende Wirkung auf die Stoffwechselaktivität der PC-3-Zellen zeigt. Am Beispiel der Stearinsäure wird deutlich, dass sich die MTT-Reduktion am besten als Marker für die tatsächliche Proliferation der Prostatakarzinomzellen eignet. Freie Fettsäuren, zugesetzt zum Nährmedium, sollten die Zusammensetzung des CLs beeinflussen. Die Auswahl der Fettsäuren in der Arbeit erfolgte mit dem Ziel verschiedene Eigenschaften von Fettsäuren abzubilden. Wert gelegt wurde auf den Sättigungsgrad, weshalb die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linol-, Arachidon- und Docosahexaensäure Teil des Experimentenplans wurden. Eine Rolle

spielte auch ihre Unterscheidung in Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren. Stearin- und Palmitinsäure als Vertreter der gesättigten Fettsäuren und die Ölsäure als einfach-ungesättigte Fettsäure vervollständigen das Spektrum. Wichtig für die Auswahl war auch das Vorkommen der Fettsäuren in unserer Ernährung, sowie die bereits vorhandenen Forschungen zu einzelnen Fettsäuren in Bezug auf Krebserkrankungen. Eine Verknüpfung zwischen diesen Forschungen und den vorliegenden Resultaten, mit dem Aspekt der CL-Beteiligung am Proliferationsprozess, würden das Bild der komplexen Interaktionen weiter vervollständigen. Besonderes Augenmerk lag in diesem Zusammenhang auf der Verteilung der CL-Spezies im Hinblick auf die freie, angebotene Fettsäure. Die Bestimmung der einzelnen Spezies erfolgte nach 72h mittels High-Performance-Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie. Es zeigte sich eine deutliche Verschiebung der Spezies hin zu jenen, in denen die freie Fettsäure aus dem Medium enthalten ist. Dieser Einfluss von freien Fettsäuren auf die Proliferation wurde für verschiedene Tumorentitäten und Modellsysteme erkannt (Oh 2015). Die erhobenen Daten belegen eindeutig, dass die mit dem Kulturmedium angebotenen Fettsäuren in die Zellen aufgenommen wurden und in das CL eingebaut werden.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Die Proliferation inhibierende und stimulierende Fettsäuren

Bezogen auf die Proteinmenge weisen die Messungen mit Linol-, Stearin-, Arachidon- und Docosahexaensäure eine signifikant verminderte Proteinbildung von 82-90% im Vergleich zur Kontrolle auf. In der MTT-Reduktionsmessung ergab sich auch eine verminderte Menge an reduziertem MTT von 79-91% der Kontrolle für die Zusätze Linol-, Stearin- und Arachidonsäure. Außerdem lag die inhibierende Wirkung bei diesem Parameter für Ölsäure mit einer Senkung um 24% im signifikanten Bereich. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden Linol-, Arachidon-, Stearin- und Ölsäure als antiproliferativ eingestuft. Für Docosahexaensäure konnte kein antiproliferativer Effekt in der MTT-Reduktion nachgewiesen werden. Die spezifische (zelluläre) MTT-Reduktion blieb ebenfalls unbeeinflusst. Deshalb wurde diese Fettsäure trotz im Vergleich zur Kontrolle gesteigerter Proteinmenge nicht als proliferationsfördernd eingestuft. Vorangehende Studien zeigten für Linolsäure einen Progress des Prostatakarzinoms (Jackson, Walker et al. 2012), wobei es sich um eine Vergleichsstudie von Prostatakrebspatienten und nicht erkrankten Kontrollen handelt, deren Fettsäureaufnahme über die Nahrung durch

Vollblutuntersuchungen bestimmt wurde. Nicht nachvollziehbar ist dabei welcher Anteil der Fettsäuren in den Prostatakarzinomzellen ankommt. Auch eine Abhängigkeit in Bezug auf den ethno-geografischen Ursprung des Prostatagewebes wird für diese Fettsäure beschrieben. Figiel et al. konnten Einflüsse wie die Ernährung anhand von Fragebögen eruieren und mit Hilfe eines Fettsäureprofils des periprostatischen Fettgewebes (PPAT) analysieren und fanden dahingehend Unterschiede zwischen Kaukasiern und afrikanisch-karibischen Probanden, wobei letztere einen doppelt so hohen Anteil mehrfach ungesättigter Omega-6-Fettsäuren, hauptsächlich Linolsäure, im PPAT aufwiesen (Figiel, Pinault et al. 2018). Außerdem zeigten sich auch genetische Variationen im Fettsäure-Metabolismus, wie verschiedene Varianten im FADS-Gen, die bei den Kaukasiern nicht nachgewiesen werden konnten und zu einer Anreicherung von Linolsäure im PPAT führten (Figiel, Pinault et al. 2018). Damit spielen äußeren Einflüsse wie zum Beispiel die Fettaufnahme über die Nahrung eine Rolle, aber auch entwicklungsbedingte genetische Unterschiede, worin die abweichenden Ergebnisse zu den vorliegenden Experimenten begründet sein könnten. Auch wird in anderen Studien Omega-3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure ein schützender Effekt vor aggressiveren Formen des Prostatakarzinoms zugesprochen, während eine Verlagerung des Verhältnisses hin zu Omega-6-Fettsäuren, wie Linol- und Arachidonsäure, nachteilige Auswirkungen haben soll (Moussa, Nguile-Makao et al. 2019). Dies widerspricht den Ergebnissen dieser Untersuchung und könnte zeigen, dass *in vivo* noch andere wesentliche Einflüsse eine Rolle für die Prostatakarzinomproliferation spielen, die in den durchgeführten Untersuchungen so nicht abgebildet werden konnten. Die unterschiedlichen Untersuchungssysteme können auch ein Grund für diese Abweichung sein. *In vivo* werden auch andere Zellen, neben den Tumorzellen selbst, beeinflusst, in unseren Untersuchungen beziehen sich die Auswirkungen auf eine reine Zelllinie. Die PC-3-Zellen sind eine androgenrezeptor-negative, ursprünglich von Knochenmetastasen stammende, hoch differenzierte Zellreihe (Nemeth, Yousif et al. 2002). Sie bildet Bedingungen bei einem hormonunabhängigen Prostatakrebs nach, der zur Metastasenbildung in den Knochen neigt (Nemeth, Yousif et al. 2002). Die verglichen mit anderen Zellreihen des Prostatakrebses schnell wachsende Zellreihe (Romijn, Verkoelen et al. 1988) machte das experimentelle Arbeiten weniger störanfällig. Die Hormonunabhängigkeit der PC-3-Zellen filtert weitere Einflussfaktoren heraus, die vor allem *in vivo* die Überprüfbarkeit stark beeinträchtigen könnten. Es geht in der vorliegenden Arbeit um Umbau- und Umstrukturierungsprozesse die durch die Fettsäuren beeinflusst werden. Diese

biochemischen Prozesse finden auf mitochondrialer Ebene statt. Die Beeinflussbarkeit durch andere Faktoren sollte möglichst gering gehalten werden, weshalb sich die PC-3-Zellen bestens für diese Untersuchung eigneten. Stearinsäure, als gesättigte Fettsäure, zeigte eine signifikant erhöhte metabolische Aktivität je Proteinmenge, allerdings legen sowohl Proteinmenge, als auch metabolische Aktivität in den Einzelmessungen eine antiproliferative Wirkung auf die PC-3-Zellen nahe, weshalb die Zuordnung zu den krebsinhibierenden Fettsäuren erfolgte. Möglicherweise hätte sich dieses Messergebnis noch zugunsten einer deutlichen Zuordnung des Quotienten verändert, wenn eine längere Inkubationszeit erfolgt wäre. Die Messungen, insbesondere im Verlauf von 4h auf 72h, sowohl zur Proteinmenge, wie auch zur MTT-Reduktion, lassen annehmen, dass Stearinsäure als Zusatz erst verspätet, im Vergleich zu den anderen Zusätzen, zu einer messbaren, aussagekräftigen Reaktion führt, was dem Umbau der Fettsäure geschuldet sein kann. Da Stearinsäure direkt eher kein Baustein des CLs ist, erfolgt zunächst hauptsächlich ein Umbau der zugesetzten Fettsäure, bevor die Produkte schließlich in dem Molekül verbaut werden. Das erklärt die zeitliche Diskrepanz bis zur messbaren Reaktion auf Stearinsäure als Zusatz und auch die, je Proteinmenge, signifikant erhöht gemessene metabolische Aktivität. Da die Messungen zu Proteinmenge und MTT-Reduktionsfähigkeit für Stearinsäure jeweils aber signifikant einen antiproliferativen Effekt belegen, erfolgte die Zuordnung zu den antiproliferativen Fettsäuren. Andere aktuelle Arbeiten belegen ebenfalls positive Effekte auf Karzinom- und Herz-Kreislaufkrankungen, Stearinsäure betreffend. Während Stearinsäure (C18:0) bei Aufnahme zu einer Fusion von Mitochondrien führt, bleibt dieser Effekt für Palmitinsäure (C16:0) aus (Senyilmaz-Tiebe, Pfaff et al. 2018). Dabei kann die Fusion der Mitochondrien eine Einstellung auf einen erhöhten Fettmetabolismus bedeuten, der durch C18:0 signalisiert wird, wodurch eine entsprechende Anpassung erfolgt. Nebeneffekt, oder in Bezug auf die Proliferation der Krebszellen auch Haupteffekt, ist dabei, dass eine mitochondriale Fusion auch zu Reparaturzwecken dient. Verschmelzen die Mitochondrien, kann eine defekte mitochondriale DNA durch die des mitverschmolzenen Mitochondriums ausgetauscht werden. Bei der Teilung entsteht ein funktionstüchtiges und ein noch stärker beschädigtes Mitochondrium. Ist die DNA des letztgenannten zu stark beschädigt, folgt der programmierte Zelltod. Hier könnte der antiproliferative Effekt der Stearinsäure, trotz ihres Sättigungsgrades, liegen. Für Palmitinsäure bleibt dieser Effekt laut Senyilmaz-Tiebe et al. aus (Senyilmaz-Tiebe, Pfaff et al. 2018).

Palmitinsäurezusatz hat laut unserem Marker, der MTT-Reduktionsfähigkeit, eine erhöhte metabolische Aktivität der Krebszellen zur Folge, wenn auch in dieser Versuchsreihe nicht ausreichend, um signifikant zu sein. Trotzdem ist es als potentiell proliferationsanregend für PC-3-Zellen zu beurteilen. Eine gesteigerte metabolische Aktivität je Proteinmenge lässt sich für diese Fettsäure ebenfalls feststellen, wie auch für Docosahexaensäure. Auch vorangegangene Studien konnten den proliferationsfördernden Effekt von Palmitinsäure auf PC-3-Zellen belegen (Landim, de Jesus et al. 2018). Allerdings sprechen einige Studien außerdem Docosahexaensäure eine Verringerung der Prostatakrebsinzidenz zu, was in Anbetracht der Experimente einen scheinbaren Widerspruch erzeugt (Eser, Vanden Heuvel et al. 2013). Ein Grund könnte, wie bei Stearinsäure, der zeitliche Versatz der Reaktion durch Umbauprozesse sein. Auch veränderte Bedingungen, sowie weitere äußere Einflüsse *in vivo* oder Unterschiede zu den Prostatakrebszellreihen können für die Diskrepanz der gemessenen Ergebnisse verantwortlich sein. Es wird angenommen, dass sich funktionelle Unterschiede zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf die Art der Immunantwort auswirken, was einer Fettsäure karzinogene- beziehungsweise antikarzinogene Wirkung verleihen kann (de Jong, Kloppenburg et al. 2014). Auch dadurch könnten die verschiedenen Ergebnisse bedingt sein. Beide Omega-6-Fettsäuren, sowohl Linol-, wie auch Arachidonsäure, zeigen in unseren Experimenten antiproliferative Eigenschaften, während die Omega-3-Fettsäure Docosahexaensäure keiner stimulierenden oder inhibierenden Wirkung klar zugeteilt werden kann, was den aktuellen Ergebnissen nach Moussa et al. widerspricht (Moussa, Nguile-Makao et al. 2019). Diese Forschungsgruppe nutzte jedoch Material von Prostatakrebspatienten mit einem niedrigen Risikoprofil, die sich für „Active Surveillance“ entschieden haben. Dies macht deutlich, dass andere Einflüsse eine Rolle spielen müssen und die Ergebnisse reiner Zellreihen zwar die Auswirkungen auf die Tumorzellen gezielt messbar machen, jedoch im komplexen Zusammenspiel *in vivo* Faktoren die reale Auswirkung einer Fettsäure auf den Tumor nicht umfassend abbilden können.

4.2.2 Lipidmetabolismus und Zellstoffwechsel

Es gibt Hinweise darauf, dass der Fettstoffwechsel eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression spielt (Hopperton, Duncan et al. 2014). Die gesteigerte Syntheseleistung ist für die Bereitstellung der neuen Zellmembranen unerlässlich, weshalb der katabole Stoffwechsel der oxidativen Phosphorylierung an die anabolen Bedingungen angepasst

werden muss. Aus diesem Grund betreiben Tumorzellen, laut Otto Warburg, Glykolyse in Gegenwart von Sauerstoff und produzieren Laktat (Ponisovskiy 2011). In unserer Versuchsreihe produzieren die Zellen der PC-3-Zelllinie unter allen experimentellen Bedingungen Laktat. Sie weisen allerdings auch alle, unter entsprechend variiertem Fettsäurezusatz, eine verminderte glykolytische Aktivität im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Abweichung des Tumorzellstoffwechsels von der Warburg-Hypothese wurde auch von anderen Gruppen nachgewiesen (Moreno-Sánchez, Rodríguez-Enríquez et al. 2007, Schulze and Harris 2012). Eine proliferationsmindernde Wirkung für Linol-, Stearin-, Arachidon- und Ölsäure geht in den Versuchen mit einer verminderten Laktatproduktion einher. Signifikanz zeigt diese Beobachtung nur für den Zusatz von Stearinsäure. Interessant und zur Warburg-Hypothese widersprüchlich ist die proliferationsfördernde Wirkung von Palmitinsäure, die aber trotzdem mit einer verminderten Laktatproduktion einhergeht. Auch wenn diese Beobachtung, einer niedrigen Untersuchungsanzahl geschuldet, nicht signifikant erscheint, ist die Wirkung von Palmitinsäure auf Krebszellen ein Ansatzpunkt für weiterführende Forschungen. Es legt nahe, dass diese Tumorzellen ihren gesteigerten Energiebedarf für die Proliferation über die oxidative Phosphorylierung decken, ohne über die Laktatdehydrogenase verstärkt Pyruvat zu Laktat zu reduzieren.

4.2.3 Cardiolipin

Das Phospholipid CL ist essentiell für eine effektive oxidative Phosphorylierung (Raja and Greenberg 2014). Es wurde erkannt, dass die Zusammensetzung der molekularen CL-Spezies und die Verteilung der Fettsäurereste signifikante Auswirkungen auf die physiologische Funktion des CLs haben (Schug, Frezza et al. 2012). Naheliegend ist daher ein kausaler Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung dieses essentiellen Phospholipids in den Mitochondrien der Prostatakarzinomzellen und deren Proliferation, durch die Beeinflussung des komplexen Energiemetabolismus. Die durchgeführte Versuchsreihe zeigte, unter Zugabe freier Fettsäuren, eindeutige Veränderungen sowohl im Gesamt-CL-Gehalt, wie auch in der veränderlichen Komposition der CL-Moleküle der PC-3-Zellen. Es konnte eine Verschiebung hin zum vermehrten Einbau der frei angebotenen Fettsäure im CL beobachtet werden und eine daraus resultierende verminderte Einbauleistung in Bezug auf andere Fettsäuren. Die Auswirkungen beziehen sich dabei nicht nur auf die Komposition der einzelnen CL-Moleküle, sondern haben je nach Fettsäure auch Einfluss auf den Gesamt-CL-Gehalt der Zellen. Das

deutet auf eine komplexe Verbindung zwischen dem Lipidmetabolismus der Zelle und der CL-Synthese hin. Um Veränderungen der Lipidzusammensetzung aufgrund eines bestimmten Lipids mit Zellfunktionen wie der Proliferation in Zusammenhang zu bringen, benötigt man ein entsprechendes Konzept. In dieser Studie haben wir nach einer Korrelation zwischen der Lipidkomposition des CLs und der Zellproliferation der Prostatakarzinomzellen der PC-3-Zelllinie gesucht. Unter allen im CL eingebauten Fettsäuren war nur die Menge an Palmitoleinsäure stark mit der Proliferation korreliert. Diese Beobachtung berechtigt zu der Annahme, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung des CL-Moleküls und der Zellproliferation gibt. Der Gesamt-CL-Gehalt lässt in Bezug auf die Proliferation der Prostatakarzinomzellen keine Korrelation zu. Auch bei dem oxidierten Anteil des Gesamt-CLs in Prozent von (C18:2)₄ ist kein kausaler Zusammenhang zur Proliferation der PC-3-Zellen nachweisbar. Eindrucksvoll ist dies dargestellt durch die Tatsache, dass sich beim Anbieten von Linolsäure der Gesamtgehalt an CL auf ein Fünffaches erhöht, die Proliferation der Zellen jedoch unter dieser Fettsäure gesenkt wird. Bei Arachidonsäure kommt es zum Abfall des Gesamt-CLs wie auch der Proliferationsrate.

Es erfolgte bereits der Beweis, dass Medikamente, die in die mitochondriale Funktion der Tumorzellen eingreifen, antikarzinogenes Potenzial haben und dabei nur begrenzte Nebenwirkungen auf die gesunde Zellpopulation zeigen (Ralph, Low et al. 2006). Weiterhin ist bekannt, dass eine Verminderung des Gesamt-CLs unter einen bestimmten Schwellenwert die mitochondriale Funktion einschränkt (Ren, Phoon et al. 2014). Das kann weiterführend in Zusammenhang mit der Korrelation von Proliferation der Prostatakarzinomzellen und dem Gehalt an Palmitoleinsäure ein neuer Angriffspunkt für weitere Forschungen werden, die sich beispielsweise mit dem Transport der Fettsäuren in die Mitochondrien oder schon der Aufnahme von Palmitinsäure im Darm beschäftigen könnten.

4.2.4 Oxidativer Stress und Krebsentstehung

Es wurde vielfach und für unterschiedliche Zelltypen nachgewiesen, dass oxidativer Stress Apoptose auslösen kann (Sinha, Das et al. 2013). Bei Krebszellen wurde eine mitochondriale Dysfunktion nachgewiesen, diese beinhaltet eine fehlerhafte oxidative Phosphorylierung. Beide Faktoren hemmen die Apoptose durch Modulation der ROS-Produktion und der zellulären Signalübertragung (Alam, Wallrabe et al. 2017). Dennoch ist speziell für das Prostatakarzinom

belegt, dass ein höheres Level an oxidativem Stress diese Krebsart induziert (Udendi and Tchounwou 2016). Diesem Widerspruch sind die Messungen zum oxidierten Anteil des CLs geschuldet. Ein Weg die Apoptose in Zellen auszulösen führt über die Oxidation des CLs. Oxidiertes CL verliert die Interaktionsmöglichkeit mit Cytochrom c, was diesem wiederum die Freisetzung und Auslösung der Apoptose ermöglicht. Außerdem wird die Eröffnung einer mitochondrialen Permeabilitätsübergangspore beeinflusst (Dudek 2017). Die Überlegung war, dass ein gesteigerter Anteil an oxidiertem CL, durch den externen Zusatz einer Fettsäure, die Apoptoserate steigert und somit antiproliferatives Potenzial besitzt. Allerdings ließ sich in dieser Arbeit diesbezüglich keine Korrelation belegen. Der Anteil an oxidiertem CL ist mit dem Zusatz von Linolsäure signifikant gemindert, trotzdem ist dieser Fettsäure aufgrund der Proteinmengenmessung und der MTT-Reduktionsfähigkeit eindeutig ein antiproliferatives Potenzial zuzusprechen. Offensichtlich benötigen die PC-3-Zellen ein bestimmtes Maß an reaktiven Sauerstoffspezies für eine starke Proliferation, das in Gegenwart von Linolsäure unterschritten wurde. Ein solcher Zusammenhang, dass erhöhte Level an reaktiven Sauerstoffspezies ein stärkeres Wachstum von Tumorzellen begünstigen, wurde in anderen Tumorzellen bereits nachgewiesen (Hu, Rosen et al. 2005). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass Tumorzellen relativ hohe Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies tolerieren können (Manda, Isvoranu et al. 2015).

4.2.5 Prostatakrebs und Ernährung

Empfehlungen bezüglich der Ernährung im Hinblick auf die Senkung des allgemeinen oder speziellen Krebsrisikos gibt es in der Literatur viele. Beim Prostatakarzinom soll pflanzlich basierte Nahrungsaufnahme ein geringeres Erkrankungsrisiko zur Folge haben (Bahrami, Movahed et al. 2019). Förderlich ist eine mediterrane Ernährungsweise, die neben viel Fisch auch Olivenöl enthält, welches reich an Ölsäure ist (Schneider, Su et al. 2019). In Bezug auf die Ölsäure würden sich die Ergebnisse mit den vorliegenden Untersuchungen decken, ein hoher Anteil mariner Fettsäuren wie Docosahexaensäure soll aber laut Epstein et al. mit 40% weniger Krebstoten verbunden sein (Epstein, Kasperzyk et al. 2012), was durch die Untersuchungen an den PC-3-Zellen nicht unterstützt werden konnte. Andere aktuelle Studien konnten diesbezüglich auch keine Korrelation zum Risiko für ein fortgeschrittenes Prostatakarzinom feststellen (Schulpen and van den Brandt 2019). Einigkeit scheint in der negativen Assoziation von Palmitinsäure und dem Krebsrisiko in Bezug auf das Prostatakarzinom zu bestehen.

Proliferationsfördernde Effekte sind nachgewiesen (Landim, de Jesus et al. 2018) und bestätigen sich auch in den beschriebenen Versuchen. Der Effekt der Stearinsäure stellt sich einheitlich positiv dar, sowohl in den aktuellen Studien (Senyilmaz-Tiebe, Pfaff et al. 2018), wie auch übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Weitere Untersuchungen erfordern die Ergebnisse zu den Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren. Die Omega-6-Fettsäuren erwiesen sich in diesen Experimenten als eindeutig antiproliferativ. Die Datenlage ist in Hinblick auf die Wirkung oder das Verhältnis der Omega-3- zu Omega-6-Fettsäuren absolut widersprüchlich. Während einige Omega-3-Fettsäuren im Vergleich zu Omega-6-Fettsäuren als protektiv anerkennen (Liang, Henning et al. 2019), stehen die Ergebnisse der erfolgten Experimente mit anderen komplett konträr dazu (Brasky, Darke et al. 2013). Liang et al. führten die Experimente zu dem Thema mit Prostatakrebs bei Mäusen durch.

Brasky et al. kommen zwar auf das gleiche Ergebnis wie die experimentellen Untersuchungen an den PC-3-Zellen, sie führten ihre Studie aber an männlichen Probanden mit unterschiedlichen Prostatakrebsstadien durch und ihre Aussagen beziehen sich auf die Blutkonzentrationen der Fettsäuren. Die Ansatzpunkte sind verschieden und nicht direkt vergleichbar. Es müssen weitere Untersuchungen *in vivo* folgen, um die tatsächlichen Auswirkungen der Fettsäuren besser beurteilen zu können.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Es konnte bewiesen werden, dass die Komposition von CL einfach durch das Anbieten externer Fettsäuren verändert werden kann. Veränderungen im CL beeinflussen die Proliferation der Prostatakarzinomzellen in der PC-3-Zelllinie. Über welchen Mechanismus dies genau geschieht, ist in weiterführenden Arbeiten zu ermitteln. Da CL überwiegend als Pro-Fusions-Lipid bezüglich der Fusion von Mitochondrien anzusehen ist (Joshi, Thompson et al. 2012), ist es auch wesentlich als Grundlage für damit verbundene Reparaturmechanismen. Die Zusammensetzung des Lipids entscheidet über seine Funktion. Es ist davon auszugehen, dass sich eine messbare Wirkung in Bezug auf die Proliferation der Zellen ergibt, je nachdem ob die Fusion ermöglicht werden kann und Mitochondrien mit fehlerhafter DNA dem programmierten Zelltod zugeführt werden können oder dieser Prozess aufgrund der veränderten Zusammensetzung behindert wird.

Anhand der Resultate der Versuche sind Linol-, Arachidon-, Stearin- und Ölsäure als antiproliferativ wirksame Fettsäuren für die PC-3-Zelllinie einzustufen. Eine Wirksamkeit auch

auf andere Zelllinien und *in vivo* muss durch weiterführende Studien überprüft werden. Für Stearinsäure ist der Mechanismus über die erfolgreiche Fusion der Mitochondrien und die damit verbundene Apoptose schwer geschädigter, im Sinne abnorm veränderter Mitochondrien und ihrer Zellen, als Grundlage für seine Wirkung gut nachvollziehbar. Ob dieser Wirkmechanismus auch für die anderen antiproliferativen Fettsäuren zu bestätigen ist, müssen weiterführende Arbeiten untersuchen. Basierend auf den Untersuchungsergebnissen des *in vitro* -Modells ist es schlüssig zu behaupten, dass CL bei humanen Prostatakarzinomzellen *in vivo* eine wichtige Rolle für die Proliferation der Zellen spielt. Auch dahingehend sind weitere Untersuchungen notwendig um zum einen die tatsächliche Beeinflussbarkeit der Prostatakarzinomzellen *in vivo* durch gezielt extern zugeführte Fettsäuren nachvollziehen und zum anderen ihre Wirkung auf die Proliferation der Karzinomzellen im Anschluss beurteilen zu können. Geeignet sind dabei aufgrund des langsamen Fortschreitens sowohl Patienten in der Phase „Active Surveillance“ wie auch die palliativen Patienten, die sich für das „Watchful waiting“ entschieden haben.

Die Untersuchungen legen nahe, dass eine Auswahl an hochwertigen Fetten wie kalt gepresstem Olivenöl mit einem hohen Anteil an Ölsäure, wie es auch in der mediterranen Küche verwendet wird, und auch exotische Öle wie Traubenkern- und Distelöl mit einem hohen Linolsäuregehalt, aber auch andere pflanzlich basierte Öle die insgesamt viel Stearinsäure enthalten, chemopräventiv eingesetzt werden könnten. Vorsicht ist bei tierischen Fetten wie Schweineschmalz und Rindertalg geboten, die neben Stearinsäure einen hohen Anteil an Palmitinsäure aufweisen.

Letztlich wäre die Aufnahme von Fettsäuren in Chemopräventionsprotokolle, wie Murray es vorschlägt (Murray, Hraiki et al. 2015), nach besseren Erkenntnissen über die tatsächlichen Auswirkungen, im Besonderen auf die mitochondriale Funktion der Zellen, sinnvoll. Es besteht das Potenzial, sie präventiv wie auch therapiebegleitend einzusetzen. Bei einem besseren Verständnis der Auswahl der Fettsäuren, in Bezug auf den Einbau in die Mitochondrien der Krebszellen, können sie perspektivisch auch therapeutisch wirksam werden und versprechen dabei ein geringes Nebenwirkungspotential.

Auch andere Ansätze in der Herangehensweise sind viel versprechend. Der Expressionsgrad des neuen, intrazellulären, fettbindenden Protein FABP5 scheint bei verschiedenen Karzinomarten eng mit der Proliferation von Krebszellen verbunden zu sein. Ein Knockdown dieses Proteins induziert Apoptose durch ein hohes Stresslevel und einen Zellzyklusstillstand

speziell bei Prostatakrebszellen. Es spielt eine wichtige Rolle im zellulären Energiestatus und ist insofern ebenfalls ein moderner Angriffspunkt für die zukünftige Krebsprävention und -therapie (Senga, Kawaguchi et al. 2018). Da es sich um ein fettbindendes Protein handelt, könnten unsere Ergebnisse auch mit diesem Protein in Zusammenhang stehen, was weitere Untersuchungen zur Klärung erfordert. Es zeigt sich, dass es noch weitreichende Möglichkeiten gibt an das Problem der Proliferation von Krebszellen und die Zusammenhänge mit der menschlichen Ernährung heranzugehen.

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Proliferation von PC-3-Zellen und der molekularen Zusammensetzung des CLs zu untersuchen. Extern zugefügte freie Fettsäuren im Medium sollten aktiv die CL-Spezies variieren. Der wichtigste Parameter für die Beurteilung der Wirkung auf die Proliferation der PC-3-Zellen war die MTT-Reduktionsbestimmungen. Nach 72h ergab diese unter dem Zusatz von Palmitinsäure eine erhöhte, jedoch nicht signifikante, metabolische Aktivität in den Prostatakarzinomzellen im Vergleich zur Kontrolle. Signifikant gesenkt stellte die Aktivität sich für Ölsäure mit 25%, Linol- und Arachidonsäure mit je 20% und Stearinsäure mit 10% Minderung dar. Die CL-Zusammensetzung veränderte sich messbar. Auch der Gesamtgehalt an CL war durch die Zusätze variabel. Die Summe der einzelnen Spezies steigt bei der Zugabe von Linolsäure auf das Vierfache der Kontrolle von $0,59 \pm 0,07$ nmol/mg auf $2,35 \pm 0,22$ nmol/mg an, während unter Arachidonsäure nur noch die Hälfte des Gesamt-CLs mit $0,32 \pm 0,04$ nmol/mg messbar war. 72h nach der Zugabe von Linolsäure wurde eine Erhöhung des relativen Anteils von (C18:2)₄-CL von $2,7 \pm 0,33\%$ am Gesamt-CL auf $33,52 \pm 2,74\%$ beobachtet. Auch beim Angebot der anderen Fettsäuren wurden diese zum Nachteil der übrigen Fettsäuren vermehrt eingebaut. Der relative Anteil der Spezies (C18:2)₃/C20:4-CL steigerte sich auf rund 230% Prozent von $2,69 \pm 2,13\%$ auf $6,15 \pm 4,28\%$ unter dem Zusatz von Arachidonsäure (C20:4). Bei Docosahexaensäure (C22:6) liegt die Steigerung des relativen Anteils an C22:6/(C18:2)₃-CL im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bei etwas mehr als 500% von $0,27 \pm 0,07\%$ auf $1,36 \pm 0,31\%$. Die Veränderungen korrelieren nicht mit denen bezüglich der MTT-Reduktion oder mit der Proliferation der PC-3-Prostatakarzinomzellen. Ein eindeutiger linearer Zusammenhang für die Veränderung der metabolischen Aktivität der Zellen und dem Fettsäuregehalt ergibt sich ausschließlich für den Gehalt an Palmitoleinsäure. Das Bestimmtheitsmaß liegt dafür bei $r^2=0,67$. Dies weist auf eine Bedeutung der CL-Komposition für die Proliferation von Prostatakarzinomzellen hin und stellt einen Ansatzpunkt für weitere Forschungen dar, von der Aufnahme über den Transport bis zum Einbau dieser Fettsäure in die Mitochondrien.

Literaturverzeichnis

1. Alam, S. R., H. Wallrabe, Z. Svindrych, A. K. Chaudhary, K. G. Christopher, D. Chandra and A. Periasamy (2017). "Investigation of Mitochondrial Metabolic Response to Doxorubicin in Prostate Cancer Cells: An NADH, FAD and Tryptophan FLIM Assay." *Sci Rep* **7**(1): 10451.
2. Aronson, W. J., N. Kobayashi, R. J. Barnard, S. Henning, M. Huang, P. M. Jardack, B. Liu, A. Gray, J. Wan, R. Konijeti, S. J. Freedland, B. Castor, D. Heber, D. Elashoff, J. Said, P. Cohen and C. Galet (2011). "Phase II prospective randomized trial of a low-fat diet with fish oil supplementation in men undergoing radical prostatectomy." *Cancer Prev Res (Phila)* **4**(12): 2062-2071.
3. Bahrami, A., M. Movahed, F. Teymoori, M. R. Mazandarani, B. Rashidkhani, A. Hekmatdoost and E. Hejazi (2019). "Dietary Nutrient Patterns and Prostate Cancer Risk: A Case-Control Study from Iran." *Asian Pac J Cancer Prev* **20**(5): 1415-1420.
4. Bidoli, E., R. Talamini, C. Bosetti, E. Negri, D. Maruzzi, M. Montella, S. Franceschi and C. La Vecchia (2005). "Macronutrients, fatty acids, cholesterol and prostate cancer risk." *Ann Oncol* **16**(1): 152-157.
5. Bogdanov, M., E. Mileykovskaya and W. Dowhan (2008). "Lipids in the assembly of membrane proteins and organization of protein supercomplexes: implications for lipid-linked disorders." *Subcell Biochem* **49**: 197-239.
6. Brasky, T. M., A. K. Darke, X. Song, C. M. Tangen, P. J. Goodman, I. M. Thompson, F. L. Meyskens, G. E. Goodman, L. M. Minasian, H. L. Parnes, E. A. Klein and A. R. Kristal (2013). "Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial." *J Natl Cancer Inst* **105**(15): 1132-1141.

8. Brouwer, I. A., J. M. Geleijnse, V. M. Klaasen, L. A. Smit, E. J. Giltay, J. de Goede, A. C. Heijboer, D. Kromhout and M. B. Katan (2013). "Effect of alpha linolenic acid supplementation on serum prostate specific antigen (PSA): results from the alpha omega trial." *PLoS One* **8**(12): e81519.
9. Carlsson, S. and A. Vickers (2015). "Spotlight on prostate cancer: the latest evidence and current controversies." *BMC Med* **13**: 60.
10. Chan, J. M., E. L. Van Blarigan and S. A. Kenfield (2014). "What should we tell prostate cancer patients about (secondary) prevention?" *Curr Opin Urol* **24**(3): 318-323.
11. Chang, S. N., J. Han, T. S. Abdelkader, T. H. Kim, J. M. Lee, J. Song, K. S. Kim and J. H. Park (2014). "High animal fat intake enhances prostate cancer progression and reduces glutathione peroxidase 3 expression in early stages of TRAMP mice." *Prostate* **74**(13): 1266-1277.
12. Choi, J., T. Yin, K. Shinozaki, J. W. Lampe, J. F. Stevens, L. B. Becker and J. Kim (2018). "Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids." *Mol Cell Biochem* **442**(1-2): 187-201.
13. Chu, C. T., H. Bayır and V. E. Kagan (2014). "LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: implications for Parkinson disease." *Autophagy* **10**(2): 376-378.
14. Chua, M. E., M. C. Sio, M. C. Sorongon and J. S. Dy (2012). "Relationship of dietary intake of omega-3 and omega-6 Fatty acids with risk of prostate cancer development: a meta-analysis of prospective studies and review of literature." *Prostate Cancer* **2012**: 826254.
15. Chua, M. E., M. C. Sio, M. C. Sorongon and M. L. Morales (2013). "The relevance of serum levels of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: A meta-analysis." *Can Urol Assoc J* **7**(5-6): E333-343.

16. Claypool, S. M. and C. M. Koehler (2012). "The complexity of cardiolipin in health and disease." *Trends Biochem Sci* **37**(1): 32-41.

17. Crowe, F. L., T. J. Key, P. N. Appleby, R. C. Travis, K. Overvad, M. U. Jakobsen, N. F. Johnsen, A. Tjønneland, J. Linseisen, S. Rohrmann, H. Boeing, T. Pischon, A. Trichopoulou, P. Lagiou, D. Trichopoulos, C. Sacerdote, D. Palli, R. Tumino, V. Krogh, H. B. Bueno-de-Mesquita, L. A. Kiemeny, M. D. Chirlaque, E. Ardanaz, M. J. Sánchez, N. Larrañaga, C. A. González, J. R. Quirós, J. Manjer, E. Wirfält, P. Stattin, G. Hallmans, K. T. Khaw, S. Bingham, P. Ferrari, N. Slimani, M. Jenab and E. Riboli (2008). "Dietary fat intake and risk of prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." *Am J Clin Nutr* **87**(5): 1405-1413.

18. D'Amico, A. V., R. Whittington, S. B. Malkowicz, D. Schultz, K. Blank, G. A. Broderick, J. E. Tomaszewski, A. A. Renshaw, I. Kaplan, C. J. Beard and A. Wein (1998). "Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer." *JAMA* **280**(11): 969-974.

19. de Jong, A. J., M. Kloppenburg, R. E. Toes and A. Ioan-Facsinay (2014). "Fatty acids, lipid mediators, and T-cell function." *Front Immunol* **5**: 483.

20. Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF. (2019, Mai). "Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms." *Leitlinienprogramm Onkologie* Retrieved 12.08.2019, 2019, from https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostatakarzinom_Kurzversion_5.1.pdf.

21. Dudek, J. (2017). "Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways." *Front Cell Dev Biol* **5**: 90.

22. Epstein, M. M., J. L. Kasperzyk, L. A. Mucci, E. Giovannucci, A. Price, A. Wolk, N. Håkansson, K. Fall, S. O. Andersson and O. Andrén (2012). "Dietary fatty acid intake and prostate cancer survival in Örebro County, Sweden." *Am J Epidemiol* **176**(3): 240-252.

23. Eser, P. O., J. P. Vanden Heuvel, J. Araujo and J. T. Thompson (2013). "Marine- and plant-derived ω -3 fatty acids differentially regulate prostate cancer cell proliferation." *Mol Clin Oncol* **1**(3): 444-452.

24. Ferlay, J., M. Colombet, I. Soerjomataram, T. Dyba, G. Randi, M. Bettio, A. Gavin, O. Visser and F. Bray (2018). "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018." *Eur J Cancer* **103**: 356-387.

25. Figiel, S., M. Pinault, I. Domingo, C. Guimaraes, R. Guibon, P. Besson, E. Tavernier, P. Blanchet, L. Multigner, F. Bruyère, O. Haillot, R. Mathieu, S. Vincendeau, N. Rioux-Leclercq, S. Lebdaï, A. R. Azzouzi, M. A. Perrouin-Verbe, G. Fournier, L. Doucet, J. Rigaud, K. Renaudin, K. Mahéo and G. Fromont (2018). "Fatty acid profile in peri-prostatic adipose tissue and prostate cancer aggressiveness in African-Caribbean and Caucasian patients." *Eur J Cancer* **91**: 107-115.

26. Hardy, S., W. El-Assaad, E. Przybytkowski, E. Joly, M. Prentki and Y. Langelier (2003). "Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin." *J Biol Chem* **278**(34): 31861-31870.

27. Hopperton, K. E., R. E. Duncan, R. P. Bazinet and M. C. Archer (2014). "Fatty acid synthase plays a role in cancer metabolism beyond providing fatty acids for phospholipid synthesis or sustaining elevations in glycolytic activity." *Exp Cell Res* **320**(2): 302-310.

28. Hu, Y., D. G. Rosen, Y. Zhou, L. Feng, G. Yang, J. Liu and P. Huang (2005). "Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress." *J Biol Chem* **280**(47): 39485-39492.

29. Huang, M., S. Narita, K. Numakura, H. Tsuruta, M. Saito, T. Inoue, Y. Horikawa, N. Tsuchiya and T. Habuchi (2012). "A high-fat diet enhances proliferation of prostate cancer cells and activates MCP-1/CCR2 signaling." *Prostate* **72**(16): 1779-1788.

30. Jackson, M. D., S. P. Walker, C. M. Simpson-Smith, C. M. Lindsay, G. Smith, N. McFarlane-Anderson, F. I. Bennett, K. C. Coard, W. D. Aiken, T. Tulloch, T. J. Paul and R. L. Wan (2012). "Associations of whole-blood fatty acids and dietary intakes with prostate cancer in Jamaica." *Cancer Causes Control* **23**(1): 23-33.

31. Ji, J., S. Baart, A. S. Vikulina, R. S. Clark, T. S. Anthonymuthu, V. A. Tyurin, L. Du, C. M. St Croix, Y. Y. Tyurina, J. Lewis, E. M. Skoda, A. E. Kline, P. M. Kochanek, P. Wipf, V. E. Kagan and H. Bayir (2015). "Deciphering of mitochondrial cardiolipin oxidative signaling in cerebral ischemia-reperfusion." *J Cereb Blood Flow Metab* **35**(2): 319-328.

32. Joshi, A. S., M. N. Thompson, N. Fei, M. Hüttemann and M. L. Greenberg (2012). "Cardiolipin and mitochondrial phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **287**(21): 17589-17597.

33. Kobayashi, N., R. J. Barnard, J. Said, J. Hong-Gonzalez, D. M. Corman, M. Ku, N. B. Doan, D. Gui, D. Elashoff, P. Cohen and W. J. Aronson (2008). "Effect of low-fat diet on development of prostate cancer and Akt phosphorylation in the Hi-Myc transgenic mouse model." *Cancer Res* **68**(8): 3066-3073.

34. Kwan, H. Y., X. Chao, T. Su, X. Q. Fu, B. Liu, A. K. Tse, W. F. Fong and Z. L. Yu (2015). "Dietary lipids and adipocytes: potential therapeutic targets in cancers." *J Nutr Biochem* **26**(4): 303-311.

35. Landim, B. C., M. M. de Jesus, B. P. Bosque, R. G. Zanon, C. V. da Silva, R. M. Góes and D. L. Ribeiro (2018). "Stimulating effect of palmitate and insulin on cell migration and proliferation in PNT1A and PC3 prostate cells: Counteracting role of metformin." *Prostate* **78**(10): 731-742.

36. Liang, P., S. M. Henning, J. Guan, T. Grogan, D. Elashoff, P. Cohen and W. J. Aronson (2019). "Effect of dietary omega-3 fatty acids on castrate-resistant prostate cancer and tumor-associated macrophages." Prostate Cancer Prostatic Dis.
37. Lin, P. H., W. Aronson and S. J. Freedland (2019). "An update of research evidence on nutrition and prostate cancer." Urol Oncol **37**(6): 387-401.
38. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
39. Manda, G., G. Isvoranu, M. V. Comanescu, A. Manea, B. Debele Butuner and K. S. Korkmaz (2015). "The redox biology network in cancer pathophysiology and therapeutics." Redox Biol **5**: 347-357.
40. Mandair, D., R. E. Rossi, M. Pericleous, T. Whyand and M. E. Caplin (2014). "Prostate cancer and the influence of dietary factors and supplements: a systematic review." Nutr Metab (Lond) **11**: 30.
41. Moreno-Sánchez, R., S. Rodríguez-Enríquez, A. Marín-Hernández and E. Saavedra (2007). "Energy metabolism in tumor cells." FEBS J **274**(6): 1393-1418.
42. Moussa, H., M. Nguile-Makao, K. Robitaille, M. H. Guertin, J. Allaire, J. F. Pelletier, X. Moreel, N. Gevariya, C. Diorio, P. Desmeules, B. Têtu, B. Lamarche, P. Julien and V. Fradet (2019). "Omega-3 Fatty Acids Survey in Men under Active Surveillance for Prostate Cancer: from Intake to Prostate Tissue Level." Nutrients **11**(7).
43. Mulkidjanian, A. Y., D. N. Shalaeva, K. G. Lyamzaev and B. V. Chernyak (2018). "Does Oxidation of Mitochondrial Cardiolipin Trigger a Chain of Antiapoptotic Reactions?" Biochemistry (Mosc) **83**(10): 1263-1278.

44. Murray, M., A. Hraiki, M. Bebawy, C. Pazderka and T. Rawling (2015). "Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs." Pharmacol Ther **150**: 109-128.
45. Musser, D. A. and A. R. Oseroff (1994). "The use of tetrazolium salts to determine sites of damage to the mitochondrial electron transport chain in intact cells following in vitro photodynamic therapy with Photofrin II." Photochem Photobiol **59**(6): 621-626.
46. Nelson, W. G. (2007). "Prostate cancer prevention." Curr Opin Urol **17**(3): 157-167.
47. Nemeth, J. A., R. Yousif, M. Herzog, M. Che, J. Upadhyay, B. Shekariz, S. Bhagat, C. Mullins, R. Fridman and M. L. Cher (2002). "Matrix metalloproteinase activity, bone matrix turnover, and tumor cell proliferation in prostate cancer bone metastasis." J Natl Cancer Inst **94**(1): 17-25.
48. Ngo, T. H., R. J. Barnard, C. N. Tymchuk, P. Cohen and W. J. Aronson (2002). "Effect of diet and exercise on serum insulin, IGF-I, and IGFBP-1 levels and growth of LNCaP cells in vitro (United States)." Cancer Causes Control **13**(10): 929-935.
49. Oh, Y. S. (2015). "Mechanistic insights into pancreatic beta-cell mass regulation by glucose and free fatty acids." Anat Cell Biol **48**(1): 16-24.
50. Paradies, G., V. Paradies, F. M. Ruggiero and G. Petrosillo (2014). "Cardiolipin and mitochondrial function in health and disease." Antioxid Redox Signal **20**(12): 1925-1953.
51. Park, S. Y., S. P. Murphy, L. R. Wilkens, B. E. Henderson and L. N. Kolonel (2007). "Fat and meat intake and prostate cancer risk: the multiethnic cohort study." Int J Cancer **121**(6): 1339-1345.
52. Ponisovski, M. R. (2011). "Warburg effect mechanism as the target for theoretical substantiation of a new potential cancer treatment." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **21**(1): 13-28.

53. Raja, V. and M. L. Greenberg (2014). "The functions of cardiolipin in cellular metabolism-potential modifiers of the Barth syndrome phenotype." *Chem Phys Lipids* **179**: 49-56.

54. Ralph, S. J., P. Low, L. Dong, A. Lawen and J. Neuzil (2006). "Mitocans: mitochondrial targeted anti-cancer drugs as improved therapies and related patent documents." *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **1**(3): 327-346.

55. Ren, M., C. K. Phoon and M. Schlame (2014). "Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin." *Prog Lipid Res* **55**: 1-16.

56. Richman, E. L., S. A. Kenfield, J. E. Chavarro, M. J. Stampfer, E. L. Giovannucci, W. C. Willett and J. M. Chan (2013). "Fat intake after diagnosis and risk of lethal prostate cancer and all-cause mortality." *JAMA Intern Med* **173**(14): 1318-1326.

57. Romijn, J. C., C. F. Verkoelen and F. H. Schroeder (1988). "Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects." *Prostate* **12**(1): 99-110.

58. Schild, L., U. Lendeckel, A. Gardemann, I. Wiswedel, C. A. Schmidt, C. Wolke, R. Walther, P. Grabarczyk and C. Busemann (2012). "Composition of molecular cardiolipin species correlates with proliferation of lymphocytes." *Exp Biol Med (Maywood)* **237**(4): 372-379.

59. Schlame, M. and M. L. Greenberg (2017). "Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin." *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1862**(1): 3-7.

60. Schlattner, U., M. Tokarska-Schlattner, R. M. Epand, M. Boissan, M. L. Lacombe, J. Klein-Seetharaman and V. E. Kagan (2015). "Mitochondrial NM23-H4/NDPK-D: a bifunctional nanoswitch for bioenergetics and lipid signaling." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **388**(2): 271-278.

61. Schneider, L., L. J. Su, L. Arab, J. T. Bensen, L. Farnan, E. T. H. Fontham, L. Song, J. Hussey, A. T. Merchant, J. L. Mohler and S. E. Steck (2019). "Dietary patterns based on the Mediterranean diet and DASH diet are inversely associated with high aggressive prostate cancer in PCaP." *Ann Epidemiol* **29**: 16-22.e11.
62. Schug, Z. T., C. Frezza, L. C. Galbraith and E. Gottlieb (2012). "The music of lipids: how lipid composition orchestrates cellular behaviour." *Acta Oncol* **51**(3): 301-310.
63. Schulpen, M. and P. A. van den Brandt (2019). "Adherence to the Mediterranean diet and risks of prostate and bladder cancer in the Netherlands Cohort Study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*
64. Schulze, A. and A. L. Harris (2012). "How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption." *Nature* **491**(7424): 364-373.
65. Senga, S., K. Kawaguchi, N. Kobayashi, A. Ando and H. Fujii (2018). "A novel fatty acid-binding protein 5-estrogen-related receptor α signaling pathway promotes cell growth and energy metabolism in prostate cancer cells." *Oncotarget* **9**(60): 31753-31770.
66. Senyilmaz-Tiebe, D., D. H. Pfaff, S. Virtue, K. V. Schwarz, T. Fleming, S. Altamura, M. U. Muckenthaler, J. G. Okun, A. Vidal-Puig, P. Nawroth and A. A. Teleman (2018). "Dietary stearic acid regulates mitochondria in vivo in humans." *Nat Commun* **9**(1): 3129.
67. Shilovsky, G. A., O. A. Zverkov, A. V. Seliverstov, V. V. Ashapkin, T. S. Putyatina, L. I. Rubanov and V. A. Lyubetsky (2019). "New C-Terminal Conserved Regions of Tafazzin, a Catalyst of Cardiolipin Remodeling." *Oxid Med Cell Longev* **2019**: 2901057.
68. Shimizu, H., R. K. Ross, L. Bernstein, R. Yatani, B. E. Henderson and T. M. Mack (1991). "Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County." *Br J Cancer* **63**(6): 963-966.

69. Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2019). "Cancer statistics, 2019." CA Cancer J Clin **69**(1): 7-34.
70. Sinha, K., J. Das, P. B. Pal and P. C. Sil (2013). "Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis." Arch Toxicol **87**(7): 1157-1180.
71. Stope, M. B., A. Sauermann, C. Rönnau, U. Zimmermann, R. Walther and M. Burchardt (2012). "Androgen receptor and heat shock proteins in progression of prostate cancer cells." Int J Clin Pharmacol Ther **50**(1): 65-67.
72. Udensi, U. K. and P. B. Tchounwou (2016). "Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis." J Exp Clin Cancer Res **35**(1): 139.
73. Wallström, P., A. Bjartell, B. Gullberg, H. Olsson and E. Wirfält (2007). "A prospective study on dietary fat and incidence of prostate cancer (Malmö, Sweden)." Cancer Causes Control **18**(10): 1107-1121.
74. WARBURG, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.
75. Williams, C. D., B. M. Whitley, C. Hoyo, D. J. Grant, J. D. Iraggi, K. A. Newman, L. Gerber, L. A. Taylor, M. G. McKeever and S. J. Freedland (2011). "A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer." Nutr Res **31**(1): 1-8.
76. Zhu, Y., H. K. Wang, Y. Y. Qu and D. W. Ye (2015). "Prostate cancer in East Asia: evolving trend over the last decade." Asian J Androl **17**(1): 48-57.

Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Cardiolipinzusammensetzung korreliert mit der Proliferation von Prostatakarzinomzellen

im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Lorenz Schild

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 06. Juli 2020

Anja Sapandowski

Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.