

**Einfluss der Inhibition der
Hyaluronsäurematrix auf die Effektivität der
metabolischen Krebstherapie mit
Dichloressigsäure**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christina Reichert

aus Düsseldorf

Düsseldorf, August 2020

aus dem Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Jens W. Fischer
2. Prof. Dr. Jörg Breitzkreutz

Tag der mündlichen Prüfung: 24.Juni.2020

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	10
1.1 Die Tumormatrix.....	10
1.1.1 Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix.....	10
1.1.2 4-Methylumbelliferon	13
1.2 Tumormetabolismus	15
1.2.1 Der Warburg-Effekt in Krebszellen	15
1.2.2 Metabolische Interventionen in der Onkologie	17
1.2.3 Dichloressigsäure	19
1.3 Zielsetzung	21
1.3.1 Das humane ösophageale Plattenepithelkarzinom	21
1.3.2 Verbindung von Metabolismus und Hyaluronsäure-Synthese	23
1.3.3 Fragen und Ziele	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Arbeitsmittel	25
2.1.1 Substanzen	25
2.1.2 Geräte	25
2.1.3 Hersteller	25
2.2 Zellkultur.....	26
2.2.1 Kultivierung	26
2.2.2 Quantifizierung der Zellzahl	26
2.2.3 Sphäroidbildung und Kultivierung	27
2.2.4 Sphäroidvolumenbestimmung	27
2.2.5 Stimulation von 2D und 3D-Kulturen.....	27
2.3 Biochemische Methoden	28
2.3.1 Western-Blot-Analyse.....	28
2.3.2 Immunzytochemie	30
2.3.3 HAbP-Immunaффinitäts-Assay.....	30
2.3.4 Glukose-6-Phosphat-Bestimmung	31
2.3.5 Acetyl-CoA-Bestimmung	31

2.3.6	UDP-Zucker-Extraktion.....	31
2.3.7	Fluorophor-assistierte-Kohlenhydrat-Elektrophorese	32
2.3.8	Sphäroid-Färbungen	32
2.3.9	Saure Phosphatase-Bestimmung	33
2.3.10	Proteinbestimmung der Zellysate.....	34
2.4	Molekularbiologische Techniken.....	34
2.4.1	Genexpressionsanalyse	34
2.4.2	Interferenz-RNA	35
2.4.3	Quantifizierung der Glykolyse und von Zitrat-Zyklus-Metaboliten mittels <i>High-Performance Liquid Chromatographie</i>	36
2.4.4	Lebendzell-Metabolismus-Messung mittels Seahorse XFe96.....	37
2.4.5	Ermittlung des Kombinationsindexes.....	39
2.5	Statistik	40
3	Ergebnisse	41
3.1	DCA stimuliert die Hyaluronsäurematrix in ESCC-Zellen auf Produkt- und Transkriptionsebene.....	41
3.1.1	Eine DCA-Behandlung von ESCCs führt zu einem Anstieg der peri- und extrazellulären HA-Konzentration	41
3.1.2	DCA erhöht die Transkription HA-assoziiierter Gene.....	42
3.1.3	Die HA-Synthese wird durch 4-MU gehemmt	43
3.2	DCA schaltet die Tumorzellen auf mitochondriale oxidative Phosphorylierung um.....	44
3.2.1	DCA reduziert dosisabhängig die zelluläre Glykolyse-Aktivität	44
3.2.2	Die DCA-Behandlung von ESCCs erhöht die mitochondriale Respiration.....	45
3.2.3	Die zelluläre Metaboliten-Konzentrationen verschieben sich unter DCA- Behandlung in Richtung der mitochondrialen Respiration.....	46
3.3	DCA erhöht das Reservoir der HA-Vorläufer und die O-GlcNAcysierung von Proteinen	51
3.3.1	Die Glukose-6-Phosphat-Konzentration wird durch eine DCA-Behandlung erhöht.....	51
3.3.2	Der HA-Vorläufer-Pool akkumuliert durch DCA-Behandlung	51
3.3.3	DCA induziert die vermehrte O-GlcNAcysierung von Proteinen.....	54
3.4	DCA in Kombination mit 4-MU führt zu reduziertem Zellwachstum und gesteigerter Apoptose-Induktion.....	56
3.4.1	DCA reduziert dosisabhängig das Zellwachstum von ESCC-Zellen.....	56
3.4.2	Die Kombinationstherapien von DCA und 4-MU aktivieren die Apoptose	59
3.5	Die Kombinationstherapie zeigt eine hohe Effektivität auf Tumor-Sphäroide	60
3.5.1	Die 3D-Kultivierung führt zu einem Anstieg der Transkription von HAS3 und zentraler Proteine der aeroben Glykolyse.....	60

3.5.2	Die DCA-Behandlung von Tumor-Sphäroiden induziert die HA-Synthese	61
3.5.3	Die Kombination von DCA und 4-MU führt zu einer Reduktion des Tumor-Sphäroidvolumens und zur Induktion der Apoptose.....	62
3.5.4	Der Effekt von 4-MU auf Tumor-Sphäroiden kann durch siRNA-Inhibition reproduziert werden	64
4	Diskussion	68
4.1	Identifikation eines neuen Resistenzmechanismus.....	68
4.1.1	Zusammenhang zwischen mitochondrialer Respiration und HA-Synthese	70
4.1.2	DCA induziert die O-GlcNAcysierung von Proteinen	73
4.2	Die Kombinationstherapie aus DCA und 4-MU zeigt einen synergistischen antiproliferativen Effekt auf ösophagealen Tumorzellen.....	76
4.2.1	Die Kombinationstherapie zeigt eine hohe Wirksamkeit auf ösophagealen Tumorzellen	76
4.2.2	DCA und 4-MU wirken synergistisch	78
4.2.3	DCA ist effektiver in 3D- als in 2D-Zellkulturen	79
4.3	Limitationen und Ausblick.....	80
5	Schlussfolgerung	82
6	Summary	83
7	Literaturverzeichnis	84
	Veröffentlichungen.....	97
	Originalarbeiten	97
	Kongressbeiträge	97
	Eidesstattliche Erklärung	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mitochondriale Respirationsbestimmung mittels Seahorse	38
Abbildung 2: Glykolyse-Bestimmung mittels Seahorse	39
Abbildung 3: DCA erhöht die HA-Konzentration im Überstand und in der perizellulären Matrix	42
Abbildung 4: Die HA-Synthasen, Hyaluronidasen und HA-Rezeptoren werden auf Transkript-Ebene durch eine DCA-Behandlung hochreguliert.....	43
Abbildung 5: 4-MU inhibiert die HA-Synthese.....	44
Abbildung 6: Die Glykolyse in ESCC wird durch DCA gehemmt.....	45
Abbildung 7: Die mitochondriale Respiration in ESCC wird durch eine DCA-Behandlung verstärkt.....	46
Abbildung 8: DCA induziert einen Anstieg in Malat und eine Reduktion in Laktat	48
Abbildung 9: Standardkurven der nachgewiesenen Metaboliten mittels HPLC	49
Abbildung 10: Metaboliten-Identifikation und Pufferhintergrundsignal-Messung	50
Abbildung 11: Die Glukose-6-Phosphat Konzentration steigt dosisabhängig durch die DCA-Behandlung.....	51
Abbildung 12: Der UDP-HA-Vorläufer UDP-N-Acetylglukosamin akkumuliert durch eine Behandlung mit DCA	52
Abbildung 13: Die DCA-Behandlung führt zu einer Erhöhung der Acetyl-CoA-Konzentration	53
Abbildung 14: Der induzierte Effekt durch DCA auf die HA-Synthese kann durch den Acetyl-CoA-Inhibitor SB204990 aufgehoben werden	54
Abbildung 15: DCA verstärkt die O-GlcNAcysierung von intrazellulären Proteinen.....	55
Abbildung 16: DCA induziert die Akkumulation der O-GlcNAcysierung von Proteinen.....	55
Abbildung 17: DCA verringert die Zellzahl der Krebszellen, zeigt jedoch keinen Effekt auf Fibroblasten.....	56
Abbildung 18: Die Kombinationstherapie von DCA und 4-MU reduziert die Zellzahl deutlicher als die Einzeltherapien	58
Abbildung 19: siRNA Inhibition von RHAMM, CD44 und HAS3 zusammen mit DCA reduziert die Zellzahl	59
Abbildung 20: DCA und 4-MU induzieren in Kombination vermehrt die Apoptose	60
Abbildung 21: Ein qPCR-Expressionsvergleich 2D versus 3D	61
Abbildung 22: DCA stimuliert die HA-Synthese in 3D-Sphäroiden.....	61
Abbildung 23: Volumenreduktion nach DCA und/oder 4-MU Behandlung von Sphäroiden	62
Abbildung 24: Die Kombinationsbehandlung von Sphäroiden mit DCA und/oder 4-MU induziert Zelltod und Apoptose.....	63
Abbildung 25: DCA und 4-MU in Kombination reduzieren die Zellvitalität	64
Abbildung 26: Das siRNA-Sphäroid-Volumen ist verringert in Kombination mit DCA...	65

Abbildung 27: Zelltod und Apoptose sind hochreguliert nach siRNA Inhibition von HAS3, CD44 oder RHAMM in Kombination mit DCA 66

Abbildung 28: Die Zellvitalität ist reduziert nach einer HA-Signalweg-Inhibition in Kombination mit DCA 67

Abbildung 29: Schematisches Model der metabolischen Interaktion zwischen Glykolyse, mitochondrialer Respiration und Hyaluronsäure-Synthese 72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	25
Tabelle 2: Herstellerverzeichnis.....	25
Tabelle 3: Zusammensetzung Sammel- und Trenngel	28
Tabelle 4: Erstantikörper und spezifische Bindeproteine	29
Tabelle 5: Zweitantikörper	29
Tabelle 6: Fluoreszenz-Farbstoff	30
Tabelle 7: qPCR Primer Sequenzen.....	35
Tabelle 8: siRNA	36
Tabelle 9: Messbereiche der Metaboliten mittels HPLC	37
Tabelle 10: Berechnung des Synergismus	57

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
2-DG	2-Deoxy-D-Glukose
3D	dreidimensional
4-MU	4-Methylumbelliferon
5-FU	5-Fluoruracil
ABC	ATP-Bindungskassetten
ACL	ATP-Zitrat-Lyase
AMAC	2-Aminoacridon
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
APH	Saure Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
BAX	Bcl-2-assoziiertes X Protein
BCA	Bicinchoninsäure
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i> Protein
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
Cas3	Caspase 3
cDNA	komplementäre DNA
CI	Kombinationsindex
CiC	<i>Zitrat-Carrier</i>
CL	ATP-Zitrat-Lyase
cPARP	gespaltenes PARP
C _T	<i>cycle threshold</i>
DCA	Dichloressigsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECAR	<i>extracellular acidification rate</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ESCC	humanes ösophageales Plattenepithelkarzinom
EthD	Ethidium Homodimer
EZM	extrazelluläre Matrix
F-6-P	Fruktose-6-Phosphat
FACE	<i>fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis</i>
FCCP	<i>Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone</i>
FCS	Fetales Kälberserum

G-6-P	Glukose-6-Phosphat
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAT	Glutamin:Fruktose-6-Phosphat Aminotransferase
GLUT	Glukose-Transporter
glykoPER	glykolytische Protonen Efflux Rate
GNAT1	Glucosamin-6-Phosphat-N-Acetyltransferase 1
HA	Hyaluronsäure
HAbP	Hyaluronsäure-bindendes Protein
HAS1-3	Hyaluronsäure-Synthase 1-3
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HYAL1	Hyaluronidase 1
IC ₅₀	die Konzentration einer Substanz, die für eine 50%ige Inhibierung <i>in vitro</i> notwendig ist
IntDen	<i>integrated density</i>
Kv-Kanal	spannungsabhängige Kaliumionenkanäle
LDHA	Laktatdehydrogenase A
LYVE	<i>lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
MCT1	Monocarboxylat-Transporter 1
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MilliQ	Ultrapure destilliertes Wasser
MPC	mitochondrialer Pyruvat-Transporter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid Hydrid
NHDF	humane dermale Fibroblasten
NSAID	nicht-steroidale entzündungshemmende Mittel
OAC	Adenokarzinom der Speiseröhre
OCR	<i>Oxygen consumption rate</i>
O-GlcNAc	O-gekoppeltes N-Acetylglukosamin
OGT	O-GlcNAc-Transferase
ESCC	Humanes ösophageales Plattenepithelkarzinom
OXPHOS	mitochondriale oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
PDK 1/2	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen 1/2
PEGPH20	PEGylierter rekombinanter menschlicher Hyaluronidase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PFK1	Phosphofruktokinase 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RHAMM	<i>receptor for hyaluronan mediated motility</i>
ROS	Reaktive-Sauerstoff-Spezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
scr	<i>Scrambled</i> -Kontrolle
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Std	Stunden
TCA	Tricarbonsäure
TE	Trypsin/EDTA-Lösung
TEAA	Triethylammonium Acetat
tPARP	ungespaltenes PARP
UDP-GlcNAc	UDP-N-Acetylglukosamin
UDP-GlcUA	UDP-Glukuronsäure
UGT	UDP-Glukuronosyltransferase
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
x g	Rotationsgeschwindigkeit

1 Einleitung

1.1 Die Tumormatrix

Karzinome sind nicht nur Ansammlungen von bösartigen Zellen, sondern komplexe Strukturen, in die viele andere Zellarten (Stroma) rekrutiert werden, die von den transformierten Zellen manipuliert werden. Das Zusammenspiel von bösartigen und gesunden umliegenden Zellen bildet die Tumormikroumgebung. Die nicht-malignen Zellen der Mikroumgebung haben eine dynamische und oft tumorfördernde Funktion in allen Phasen der Tumorprogression [1]. So haben die Tumormikroumgebung und die stromalen Zellen in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen und sind nun Gegenstand eines breiten Forschungsfeldes. Diese Mikroumgebung besteht aus der extrazellulären Matrix (EZM) und den stromalen Zellen wie Fibroblasten [2], Adipozyten [3], Endothelzellen [4], Pericyten [5] und Zellen des Immunsystems [6, 7]. Die EZM ist die nicht-zelluläre Komponente, die in allen Geweben und Organen vorhanden ist. Sie bietet nicht nur ein wesentliches physikalisches Gerüst für die zellulären Bestandteile, sondern initiiert auch wichtige biochemische und biomechanische Signale, die für die Gewebemorphogenese, Differenzierung und Homöostase erforderlich sind [8]. Mit zunehmendem Alter eines Gewebes nimmt der Gehalt an EZM-Proteinen ab. Dieser Prozess führt über einen Verlust von Zellintegrität zu einer Beeinträchtigung der EZM-Organisation und der epithelialen Funktion und kann altersbedingte Krankheiten wie Krebs fördern [9, 10].

Während einige Aspekte des Stromas seit Langem bekannt sind, insbesondere die Auswirkungen auf die Tumorangiogenese und die Remodellierung der EZM, sind einige Einflüsse der Tumormikroumgebung auf Tumorwachstum und -progression bis heute nicht vollständig verstanden [11-13]. Die Entwicklung, Struktur und Funktion der Zellen in der Tumormikroumgebung weisen viele Parallelen zu den Prozessen der Wundheilung auf. Daher werden Tumore oft als niemals heilende Wunden beschrieben, da in den malignen Zellen entzündliche und wundheilende Prozesse aktiviert werden [14].

1.1.1 Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix

Die EZM bildet das Gerüst von Geweben und Organen. Es handelt sich um ein komplexes Netzwerk von extrazellulären Proteinen wie Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen (GAG) und Glykoproteinen, die supramolekulare Aggregate und flächenhafte Netzwerke bilden. Proteoglykane bestehen aus einem Kernprotein, an das eine oder mehrere GAG-Ketten gleichen oder unterschiedlichen Typs kovalent

gebunden sind. Diese multimolekularen Strukturen sind mit EZM-Molekülen verbunden, die ebenfalls miteinander vernetzt sind. So bilden sie komplexe dreidimensionale Matrixnetzwerke, die eine hohe Dynamik aufweisen [15]. GAGs sind lineare, negativ geladene Heteropolysaccharide, die aus repetitiven Disaccharideinheiten, wie im Falle der Hyaluronsäure N-Acetylglukosamin und Glukuronsäure, aufgebaut sind. Unterschiede der GAGs sind in der Art des Monosaccharids sowie in dessen Sulfatierung zu finden und führen unter anderem zu folgenden Arten von GAGs: Hyaluronsäure (HA), Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparin, Heparansulfat und Keratansulfat [15]. HA wird nicht wie die anderen GAGs im Golgi, sondern an der intrazellulären Plasmamembran durch die HA-Synthasen 1-3 (HAS1, 2, 3) synthetisiert. Alle anderen GAGs werden erst nach ihrer Bildung im Golgi an die Zellmembran transportiert und dann freigesetzt. Hochmolekulare HA findet sich in der Synovialflüssigkeit, die Gelenke und Knorpel umgibt, im Glaskörper des Auges und in diversen Geweben, wie z.B. der Haut. Sie gilt als Schlüsselfaktor bei der Gewebshomöostase sowie bei Krebserkrankungen und Entzündungen [16]. Ein Großteil dieser HA-Wirkungen wird über HA-Rezeptoren wie den *cluster of differentiation 44* (CD44), den *receptor for hyaluronan mediated motility* (RHAMM) oder den *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor* (LYVE) vermittelt [17]. Der HA-Katabolismus wird durch eine Familie von Endo-N-Acetylhexosaminidasen, den Hyaluronidasen, gesteuert. Sechs verschiedene Hyaluronidase-Gene (HYAL1, 2, 3, 4, HYALP1 und PH-20) wurden im humanen Genom identifiziert [18].

1.1.1.1 Hyaluronsäure und Tumorprogression

In der Tumormikroumgebung stellt HA als Bestandteil der perizellulären EZM ein dreidimensionales Gerüst für Zellen bereit und reguliert das Verhalten von Stroma- und Tumorzellen [19-21]. Krebszellen produzieren erhöhte Mengen an HA, die von den Zellen sezerniert wird und in der Tumormikroumgebung mit Rezeptoren, wie dem CD44, interagiert. HA kann als hochmolekulares Polymer auftreten und Molekulargewichte von über 10^7 Da erreichen, kann aber auch in Form von Oligosacchariden auftreten, die nur wenige Disaccharid-Einheiten umfassen. Viele Publikationen belegen, dass das Molekulargewicht einen starken Einfluss auf die ausgelösten zellulären Prozesse hat [22, 23]: Große Hyaluronsäureketten sind an der Embryogenese beteiligt, schützen die Widerstandsfähigkeit der Epithelschicht und fördern die Wundheilung. Werden HA-Polymere von Hyaluronidasen zu kleineren Fragmenten verdaut, fördern diese Entzündungen und Angiogenese. Diese kurzkettigen HA-Polymere aktivieren über die oben genannte Rezeptoren Signalwege, die eine Reihe von krebsfördernden Signalen vermitteln, und so die Zellproliferation,

Invasion, Adhäsion, Motilität fördern und eine Rolle in der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und der Stammzellerneuerung spielen [24]. Der Hauptrezeptor für HA ist CD44, der Zellsignalwege aktiviert, die die Zellproliferation stimulieren [25], das Zellüberleben erhöhen [26], das Zytoskelett modulieren [27] und die Zellmotilität [28] steigern. Insbesondere die Varianten von CD44 (CD44v) konnten in mehreren korrelativen Studien bei humanem Bauchspeicheldrüsenkrebs als Marker für den Krankheitsverlauf verwendet werden [29, 30]. Die Existenz der intrazellulären HA ist gut dokumentiert, aber ihre genauen Funktionen sind noch nicht eindeutig geklärt. Intrazelluläre HA findet sich im Zytoplasma, im Kern und im Nukleolus. Die HA-Synthese ist bei proliferierenden Zellen stärker ausgeprägt; hier ist es mit den Mikrotubuli, RHAMM und der mitotischen Spindel assoziiert und erhält die Stabilität der Spindelpole aufrecht [31]. Eine Häufung intrazellulärer HA wird auch in Verbindung mit zellulären Stressreaktionen wie Entzündungen beobachtet. Die genauen molekularen Mechanismen der HA-Funktionen sind allerdings unklar [22].

Dementsprechend sind erhöhte Mengen an HA häufig in bösartigen Tumoren und dem umliegenden Stroma zu finden. Stromazellen wie mesenchymale Stammzellen und Fibroblasten haben dabei oft den größeren Anteil an der HA-Synthese [32]. Histopathologische Analysen haben nachgewiesen, dass die Akkumulation von HA, HA-Synthasen, HYALs und HA-Rezeptoren bei Brustkrebs [32, 33], Prostatakrebs [34], Eierstockkrebs [35] und Lungenkrebs [36] mit einer erhöhten Tumoraggressivität und einem schlechten Krankheitsverlauf korreliert.

1.1.1.2 Hyaluronsäure als Zielstruktur in der Tumorthherapie

Die Assoziation der HA mit einer Förderung von Tumorwachstum, Tumorprogression und Therapieresistenz und mit einem reduzierten Überleben deutet darauf hin, dass HA eine mögliche therapeutische Zielstruktur für die Behandlung von Krebs darstellen könnte. Es wurde bereits mehrere Strategien publiziert, die zur Reduktion von HA in Krebsmodellen eingesetzt wurden, darunter die Blockierung der HA-Signalweiterleitung, die Förderung des HA-Abbaus und die Hemmung der HA-Synthese.

Der Rezeptor CD44 ist ein transmembranes Glykoprotein, das in vielen Krebsarten einschließlich Krebsstammzellen stark exprimiert vorliegt. HA ist der spezifischste Ligand für eine CD44-Aktivierung. An den aktivierten Signalwegen sind unter anderem die Kinasen Ras, MAPK und die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) beteiligt [25]. CD44 kann jedoch auch mit weiteren Molekülen der EZM wie Kollagen, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Chondroitinsulfat, Osteopontin und L-Selektin interagieren. In vielen Fällen bindet CD44 erst an seine Liganden, nachdem eine Aktivierung durch

äußere Reize erfolgt ist [37]. Beispiele für gegen CD44 gerichtete Therapien sind neutralisierende Antikörper [38], Flavonoide [39], Vitamin D Analoga [40], *small interfering* RNA (siRNA) [41] und HA-Oligomere [42, 43]. Diese Strategien befinden sich in verschiedenen Phasen der präklinischen und klinischen Prüfung.

Das therapeutische Potenzial der Remodellierung der Tumor-Mikroumgebung durch HA-Depletion wurde in vielen Publikationen belegt. Interessanterweise führt die intravenöse Zugabe von PEGylierter rekombinanter menschlicher Hyaluronidase (PEGPH20) zunächst zum Abbau stromaler HA, bevor auch die tumorassoziierte HA entfernt wird. Dies trägt zum Abbau des Stromas bei und ermöglicht so den Zugang von Chemotherapeutika zum Zielgewebe [44]. Derzeit laufen mehrere klinische Studien zur Evaluierung von PEGPH20 in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika (NCT02921022 NCT02487277, NCT02715804), darunter Anti-PD-1-Antikörper bei Bauchspeicheldrüsenkrebs (NCT03481920) und Gallenblasenkrebs (NCT03267940).

Am effektivsten kann die Wirkung der HA durch die Inhibition ihrer Synthese gehemmt werden. Der am weitesten verbreitete niedermolekulare, orale verfügbare HA-Synthese-Inhibitor ist 4-Methylumbelliferon (4-MU) [45]. Es gibt eine zunehmende Zahl von Untersuchungen, die 4-MU zur Hemmung von HA für experimentelle Zwecke verwenden. Diese Arbeiten bilden eine wichtige Grundlage für den Einsatz von 4-MU in klinischen Studien [46].

1.1.2 4-Methylumbelliferon

4-MU ist ein Derivat des sekundären Pflanzeninhaltsstoffs Kumarin. Andere Kumarinderivate wie Phenprocoumon (Marcumar®) und Warfarin (Coumadin®) werden aufgrund ihrer antikoagulatorischen Wirkung eingesetzt, um thrombotische kardiovaskuläre Ereignisse z.B. im Rahmen eines Vorhofflimmerns zu verhindern. Umbelliferon ist ein Hydroxy-Derivat des Kumarins und kommt unter anderen im Liebstöckel (*Levisticum officinale*) und der Kamille (*Matricaria recutita*) vor [46]. 4-MU ist eine an Position 4 methylierte Variante des Umbelliferons. Obwohl es sich um ein Kumarinderivat handelt, besitzt es keine antikoagulierenden Eigenschaften, sondern wird wegen seiner krampflösenden Wirkung auf die Gallenwege meist zur Behandlung von Gallenwegsspasmen und biliärer Dyskinesie eingesetzt. Es ist für diese Indikation in einigen europäischen Ländern unter dem Freinamen Hymecromon als zugelassenes Medikament im Handel [47, 48].

1.1.2.1 Wirkungsmechanismus

Es wird angenommen, dass 4-MU die HA-Produktion auf mindestens drei Arten hemmt. Zunächst dient 4-MU als konkurrierendes Substrat für die Uridindiphosphat (UDP)-Glukuronosyltransferase (UGT), ein Enzym, das mittelbar an der HA-Synthese beteiligt ist [49]. HA wird von den Hyaluronsäure-Synthase 1-3 (HAS1-3) aus den Vorläufern UDP-Glukuronsäure (UDP-GlcUA) und UDP-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) hergestellt. UGT katalysiert dabei die Übertragung einer UDP-Gruppe auf N-Acetylglukosamin und Glukuronsäure. Die Verfügbarkeit von UDP-GlcUA und UDP-GlcNAc ist dabei von entscheidendem Einfluss auf die HA-Synthese [50]. Wird 4-MU verabreicht, konkurriert dieses mit UDP und wird von der UGT kovalent über seine Hydroxylgruppe an Glukuronsäure gebunden. Infolgedessen nimmt die Konzentration von UDP-GlcUA im Zytosol ab und die HA-Synthese wird reduziert. 4-MU hemmt dadurch den HA-Vorläuferpool in den Zellen.

Zweitens reduziert 4-MU die Expression von Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) der HA-Synthasen in unterschiedlichen Krebszelllinien [45]. Der Expressionsgrad verschiedener HAS-Gene wurde in mehreren Untersuchungen mit der Syntheserate von Hyaluronsäure korreliert [51, 52]. Obwohl die transkriptionelle Repression der HAS-Gene gut belegt ist, sind derzeit keine 4-MU-initiierten zytoplasmatischen Signale bekannt, die die HAS-Expression beeinflussen könnten [45]. In Verbindung mit dem primären Effekt, der Reduktion des UDP-GlcUA-Gehalts, kann spekuliert werden, dass dieses Zuckernukleotid nicht nur in der HA-Synthese, sondern auch direkt oder indirekt auf nuklearer Ebene die Transkription bestimmter Gene kontrolliert [53]. Die Verfügbarkeit von UDP-GlcUA ist allerdings auch ein Regulator der Transkription von HAS2 und HAS3 [50].

Zuletzt wurde eine Verbindung von 4-MU mit der mitochondrial induzierten Apoptose in unterschiedlichen soliden Krebsarten identifiziert [54, 55]. Aktuelle Untersuchungen ergaben, dass die 4-MU-induzierte Apoptose mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials, der Erhöhung von *p53*-mRNA, von Zytochrom c und dem pro-apoptotischem *B-cell lymphoma 2* Protein (Bcl-2)-assoziiertes X Protein (BAX) und einer Verminderung von anti-apoptotischem BCL2-Protein verbunden ist [56, 57]. Zusätzlich führte eine Behandlung mit 4-MU zu einer Erhöhung der intrazellulären Reaktive-Sauerstoff-Spezies (ROS). ROS, einschließlich Superoxidationen und Wasserstoffperoxid, stammen hauptsächlich aus der mitochondrialen Atmungskette und führen zu mitochondrial induzierter Apoptose [56].

Die Behandlung von Krebszellen mit 4-MU wirkt also hemmend auf das Zellwachstum und die Zellproliferation, einerseits durch den Verlust der protektiven Wirkung der HA durch die Hemmung der Substratverfügbarkeit und durch die Suppression der Synthasen-Expression, andererseits durch die Induktion der mitochondrialen Apoptose.

1.1.2.2 Klinische Studien und Wirksamkeit von 4-MU

Die größten Erkenntnisse über die Wirksamkeit von 4-MU wurden durch *in vitro*-Studien mit Krebszelllinien und deren *in-vivo*-Modellen gewonnen. Im Jahr 2006 wurde die erste *in vivo*-Analyse zur Untersuchung der Wirkung von 4-MU auf Bauchspeicheldrüsenkrebszellen veröffentlicht [58]. Das Fazit dieser Arbeit war, dass 4-MU die Proliferation, Migration und Invasion verschiedener Krebszelltypen hemmt, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die vorhandenen *in vitro*- und *in vivo*-Daten deuten darauf hin, dass Hymecromon als Bestandteil von Therapieschemata gegen HA-produzierende Krebsarten wirksam sein könnte. Allerdings besteht noch Forschungsbedarf zur Sicherheit, der Dosierung und dem Mechanismus [46]. Da Hymecromon ein zugelassenes Arzneimittel darstellt, sind bereits einige Daten zur Sicherheit dieses Medikaments verfügbar. Außer Durchfall oder anderen milden gastrointestinalen Symptomen sind keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beschrieben [59, 60].

1.2 Tumormetabolismus

Alle Zellen benötigen eine Energiequelle, um die Homöostase aufrechtzuerhalten. Die Homöostase beinhaltet strukturierte, energieaufwändige Prozesse wie die Erzeugung von Konzentrationsgradienten, Zytoskelettdynamik, Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Reparatur, basale Transkription und Translation, Proteinumsatz und Vesikeltransport. Krebszellen vermehren sich typischerweise mit einer deutlich erhöhten Teilungsgeschwindigkeit im Vergleich zu gesunden Zellen. Um diese proliferative Kapazität zu erreichen und aufrechtzuerhalten, müssen Krebszellen die Aktivität verschiedener Stoffwechselwege erhöhen [61].

1.2.1 Der Warburg-Effekt in Krebszellen

Organismen weisen bei schnellem Wachstum eine erhöhte Rate der Glykolyse auf. Otto Warburg beobachtete bereits 1924, dass Krebszellen viel größere Mengen an Glukose aufnehmen als ihre nicht transformierten Gegenstücke. Die Glukose wird dabei auch unter sauerstoffreichen Bedingungen in der Glykolyse zu Laktat verstoffwechselt. Dieses Phänomen wird als aerobe Glykolyse oder Warburg-Effekt bezeichnet [62]. Die Glykolyse ist ineffizient in Bezug auf die Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion, da sie nur zwei ATP-Moleküle pro Molekül Glukose erzeugt,

während die vollständige Oxidation eines Glukosemoleküls durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien bis zu 36 ATP-Moleküle erzeugen kann. Jedoch kann die Energie durch Glykolyse in kürzerer Zeit produziert werden. Zudem ist dieser Prozess nicht auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung angewiesen. Die nicht benötigten Mitochondrien werden in Zuge dessen inaktiviert und auch andere mitochondriale Funktionen gehemmt [63]. Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) steht im Zentrum des oxidativen Glukosemetabolismus. Der mitochondriale Pyruvat-Transporter (MPC) transportiert das Pyruvat in die Mitochondrien, wo es durch den PDC zu Acetyl-CoA umgewandelt wird. PDC katalysiert diese geschwindigkeitsbegrenzende oxidative Decarboxylierung von Pyruvat, das dann als Acetyl-CoA im Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus verwendet wird. Es verbindet die Glykolyse mit dem TCA-Zyklus und stellt damit einen wichtigen regulatorischen Schritt im Glukosestoffwechsel dar [64]. Die Aktivität der PDC wird durch ihre Phosphorylierung reguliert und ist ein wichtiger Faktor für die Bildung und/oder Progression von Tumoren. Eine Phosphorylierung durch Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDK) führt zu einer Inhibierung des Komplexes und damit zu einer Verstärkung der aeroben Glykolyse. Die Aktivität von PDK wird durch ATP, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid (NADH) und Acetyl-CoA stimuliert. Die Expression des PDK1-Gens ist in Krebszellen oft hochreguliert. So wird durch eine aktive PDK die PDC inhibiert, was in einem geringeren Pyruvat-Flux in die Mitochondrien und in einer geringen TCA-Aktivität resultiert [65].

Die Bedeutung der aeroben Glykolyse für die Zellproliferation geht über die rapide ATP-Produktion hinaus. Die Generierung neuer Tochterzellen erfordert die Replikation aller Zellinhalte, einschließlich DNA, RNA, Proteine und Lipide. Daher besteht die zusätzliche Funktion der verstärkten Glykolyse in proliferierenden Zellen unter anderem darin, dass Niveau der glykolytischen Zwischenprodukte als makromolekulare Vorläufer konstant zu halten. So werden bestimmte Glukosemetaboliten für die Synthese von essentiellen Zellbestandteilen benötigt [66]. Zusätzlich wird in schnellteilenden Zellen ein Großteil der Glukose in Laktat umgewandelt. Die Laktatbildung spielt eine wichtige Rolle in der Glykolyse: aus Pyruvat und NADH wird Laktat und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) generiert. Das freigewordene Hydridion aus dieser Reaktion wird dann benötigt um das energiereiche Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und schlussendlich ATP zu bilden. Damit die Glykolyse fortgesetzt werden kann, muss das NAD⁺/NADH-Redox-Gleichgewicht gehalten werden. So nimmt das NAD⁺ wiederum das Hydridion auf, dass bei dem Zerfall von GAPDH zu ATP freigesetzt wird [67]. Die Laktatbildung kann für Tumorzellen auch von sekundärem Nutzen sein. Die Ausscheidung hoher

Laktatmengen kann Tumorprogression, -wachstum und -metastasierung unterstützen, indem sie die Mikroumgebung des Tumors moduliert [68]. Ein wesentlicher Faktor bei der Tumorentwicklung ist die Unfähigkeit des Immunsystems, transformierte Zellen ausreichend zu eliminieren. Extrazelluläres Laktat hemmt z.B. die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen und die Freisetzung von Zytokinen [69]. Zusätzlich wird das freigesetzte Laktat durch die umliegenden Stromazellen aufgenommen, die komplementäre Stoffwechselwege exprimieren, um die Produkte der aeroben Glykolyse zu puffern, um damit das Überleben der Krebszellen zu sichern [70]. Die extrazelluläre Hypoxie induziert auch wichtige tumorprotektive Signalwege in den Krebszellen. Das rapide Zellwachstum der Tumore kann zu hypoxischen Bedingungen führen, in Folge dessen kann dies zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktors 1 (HIF-1) führen [71]. HIF-1 ist Schlüssel-Regulator zahlreicher Proteine und Enzyme, die am Glukosestoffwechsel beteiligt sind. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 induziert auch die Transkription von PDK, den Glukose-Transporter (GLUT) und von weiteren glykolytischen Enzymen sowie LDHA [72] und unterstützt damit die Stabilisierung des Warburg-Effekts in Tumorzellen.

1.2.2 Metabolische Interventionen in der Onkologie

Der veränderte Stoffwechsel der Krebszellen hat in den vergangenen fünfzehn Jahren eine zunehmende Bedeutung in der Tumorforschung erlangt. Dabei können unter anderem zwei verschiedene Ansätze genutzt werden: die Senkung des Blutzuckerspiegels (systemischer Ansatz) [73] oder die Hemmung bestimmter Enzyme in der Glykolysekaskade (zellautonomer Ansatz) [74, 75]. Dieses Ziel kann durch diätetische oder pharmakologische Maßnahmen erreicht werden.

Auf der Beobachtung, dass eine moderate, chronische Kalorienrestriktion die Krebsinzidenz bei *in vivo*-Untersuchungen signifikant reduziert, basieren viele der derzeit untersuchten anti-tumoralen Ernährungsansätze [76, 77]. Diese basieren auf einer Einschränkung oder Modulation der Nährstoffzufuhr, die die Metabolitenzufuhr zu Tumorzellen reduzieren kann. Angesichts der Vielfalt der möglichen Ansätze und ihrer komplexen Auswirkungen auf die Vielzahl der Blutstoffwechselprodukte ist es jedoch kein leichtes Ziel, die ideale Ernährungsstrategie zu identifizieren. Daher zeigten pharmakologische Therapien noch eine höhere Effizienz zum Zeitpunkt dieser Arbeit [78].

Die Liste der chemischen Verbindungen, die auf den Tumorstoffwechsel abzielen, ist lang und wird ständig erweitert. Einige Moleküle erscheinen aufgrund ihrer biochemischen Mechanismen und präklinischen/klinischen Daten über Verträglichkeit

und Wirksamkeit am vielversprechendsten. Eines der interessantesten Medikamente ist Metformin. Das Referenzmedikament für die Typ-II-Diabetes-Behandlung hemmt die intestinale Glukoseaufnahme, die Leberneoglukogenese und sensibilisiert das periphere Gewebe für Insulin [74]. Der Einsatz von Metformin bei Diabetikern wurde im Vergleich zu anderen antidiabetischen Behandlungen konsequent mit einem reduzierten Lungenkrebs- und Brustkrebsrisiko und einer besseren Prognose in Verbindung gebracht [79, 80]. Obwohl mehrere prospektive Studien Metformin untersuchen, konnte eine verbesserte Wirksamkeit von Metformin in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika bisher nicht nachgewiesen werden [81, 82]. Ein anderes Medikament ist Aspirin, das am häufigsten verwendete nicht-steroidale entzündungshemmende Mittel (NSAID). In Untersuchungen konnten interessante metabolische und anti-tumorale Eigenschaften nachgewiesen werden. In höheren Dosierungen reduziert Aspirin systemische und lokale Entzündungen und hat potenzielle Auswirkungen auf den systemischen Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel, insbesondere bei Diabetikern [83]. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass hochdosiertes Aspirin Krebspatienten über einen längeren Zeitraum hinweg sicher verabreicht werden kann, da es in klinischen Studien zu vermehrten Auftreten von lebensbedrohlichen Blutungen kam. Jedoch untersuchen laufende prospektive Studien es als adjuvante Behandlung mit niedrig dosierter Verabreichung nach radikalen Operationen [84, 85]. Auch andere NSAIDs, wie das Celecoxib, zeigen einen anti-tumorösen Effekt über die Reaktivierung der mitochondrialen Atmungskette und die daraus resultierenden ROS-abhängigen Apoptose [86]. In Kombination mit 5-Fluoruracil (5-FU) konnte Celecoxib die Effektivität der Anti-Tumortherapie durch die Inhibition des AKT-Signalweges und vermehrter ROS-Produktion verstärken [87].

Eine andere effiziente Therapiemöglichkeit betrifft den Laktatstoffwechsel. Dies kann durch die Inhibition der LDHA durch Gossypol geschehen. Es führt dazu, dass die Produktion von NAD⁺ und damit die Energieproduktion der Krebszellen zum Stillstand kommt [88]. Klinische Studien zur Untersuchung von Gossypol bei verschiedenen soliden Krebsarten laufen noch, aber es bestehen ernsthafte Bedenken hinsichtlich der schlechten Verträglichkeit und der Wirksamkeit [89]. Eine weitere Möglichkeit, den Laktatstoffwechsel zu beeinflussen, besteht darin, den Export von Laktat in die extrazelluläre Umgebung zu hemmen. Tatsächlich zwingt die Akkumulation von intrazellulärem Laktat die reversible Reaktion in Richtung Pyruvatproduktion und verhindert damit die Regeneration von NAD⁺. AZD3965 ist ein Inhibitor des Laktattransporters Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1), der auf der Zellmembran mehrerer Tumore in hohem Maße exprimiert wird; außerdem prognostizieren hohe MCT1-Werte schlechte Patientenergebnisse [90, 91]. Klinische Studien testen die

Verträglichkeit und Antitumor-Wirksamkeit von AZD3965 bei soliden Tumoren, jedoch stehen die Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt aus (NCT01791595). Ein weiterer Angriffspunkt der Tumorthherapie ist die PDK, die wie zuvor beschrieben in vielen Krebsarten hochreguliert ist und ein zentraler Regulator der Glykolyse und der mitochondrialen Respiration ist [65].

1.2.3 Dichloressigsäure

Dichloressigsäure (DCA) ist eine chlorierte Carbonsäure. Bei oraler Verabreichung als Natriumsalz wird DCA schnell resorbiert. DCA wurde bereits in oraler Form zur Behandlung von Kindern mit angeborenen mitochondrialen Defekten eingesetzt [92].

1.2.3.1 Wirkungsmechanismus

DCA, ein strukturelles Analogon von Pyruvat, stimuliert die PDC-Aktivierung durch mindestens zwei Mechanismen. Der erste und am besten etablierte Wirkungsmechanismus ist die Hemmung von PDKs, wodurch das PDC in seiner unphosphorylierten, aktiven Form erhalten bleibt [93]. Isoformspezifische Unterschiede der PDKs führen zu Variationen in der Regulation der PDC-Aktivität, wobei PDK2 das einzige ubiquitär exprimierte Isoenzym ist [94]. Eine Hemmung der PDK2-Expression durch siRNA imitiert die Wirkung von DCA in der Erhöhung der von Mitochondrien stammenden ROS und der durch diese ausgelösten Apoptose [95, 96]. Durch die Blockade von PDK verringert DCA die Laktatproduktion und schaltet den Glukosestoffwechsel von der Glykolyse in Richtung oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien um. Diese Eigenschaft wurde bereits im Rahmen der Behandlung einer angeborenen Laktatazidose [97], von myokardialer Ischämie oder Herzinsuffizienz [98] und zur Modulation der Belastungstoleranz untersucht [99]. Die PDK-Hemmung durch DCA erfolgt schnell und reversibel *in vivo*; die stimulierende Wirkung des Medikaments auf die PDC-Aktivität tritt innerhalb von 15-30 min nach einer einzelnen oralen oder parenteralen Dosis ein und lässt innerhalb von 12-24 h nach der Verabreichung nach [100]. Der zweite Mechanismus, mit dem DCA die PDC-Aktivität erhöht, besteht darin, dass es den Umsatz des Komplexes hemmt. Die Erhöhung der Enzymstabilität konnte in Primärkulturen von Fibroblasten von PDC-defizienten Patienten, die mit DCA behandelt wurden, beobachtet werden. Der molekulare Mechanismus, der für die Stabilisierung des PDC durch DCA verantwortlich ist, ist unbekannt [101, 102]. Die Stabilisierung des PDC durch DCA steht im Einklang mit dem langfristigen Laktatsenkenden Effekt des Medikaments, der mit seiner wiederholten Verabreichung am Menschen beobachtet wird. Zusammen führen beide Mechanismen zu einer

langanhaltenden Wirkung, die noch nach der Elimination von DCA aus dem Plasma fortbesteht [103].

Die Konzentration der Zielstruktur des DCAs, PDK, ist in Tumoren erhöht; durch die Verwendung von DCA kann diese blockiert werden. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der mitochondrial induzierten Apoptose. DCA wurde allein oder in Kombination mit anderen Therapien bereits in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 1-50 mM in Tumorzelllinien getestet [104-106]. DCA senkt den Blutlaktatspiegel *in vivo* beim Menschen in Dosen von etwa 5 mg/kg/24h [107] und bei Nagetieren, die DCA schneller metabolisieren, in Dosen von etwa 25-50 mg/kg/24h [108].

1.2.3.2 Klinische Studien

Die Behandlung von Patienten mit DCA erfolgt seit vielen Jahren und über einen großen Konzentrationsbereich, jedoch demonstrierten nur die höchsten Dosen eindeutig tumorreduzierende Effekte. Orale, tägliche Dosen von DCA beim Menschen variieren typischerweise zwischen 25 und 100 mg/kg Körpergewicht für kurzfristige oder chronische Behandlungen [108]. So wurde beispielsweise in neueren Phase-I-Studien bei Lungenkarzinom- und Glioblastom-Patienten eine effektive Dosis von 25-50 mg/kg/Tag definiert [109-111]. Eine Phase-II-Studien mit einer Kombination von Cisplatin und DCA zeigte bis jetzt jedoch noch keine eindeutigen Ergebnisse (NCT01386632). Es ist daher wichtig, die Mechanismen hinter einem unzureichenden Ansprechen auf eine DCA-Behandlung zu untersuchen und neue synergistische Kombinationspartner für die Therapie mit DCA zu finden [112-115].

1.2.3.3 Therapie-limitierende Nebenwirkungen von DCA

Die Humantoxizität durch chronische DCA-Exposition ist im Allgemeinen auf die reversible sensorische und motorische periphere Neuropathie beschränkt, von der heute bekannt ist, dass ihr Auftreten durch das Alter und den Genotyp des Patienten beeinflusst wird [116]. So wurde beispielsweise in den zuvor genannten Phase-I-Studien eine schwere reversible Neuropathie bei 38-86 % der Patienten detektiert [109-111]. Eine Reduktion der DCA-Dosis auf 6,5-12,5 mg/kg/Tag oder eine Intervallgabe der hohen Dosen verbesserte im Allgemeinen das Auftreten dieser Nebenwirkung, führte aber zu einem Verlust der Tumorwachstumsreduktion [110-112].

Experimentelle *in vitro* Daten deuten darauf hin, dass die Schwann-Zellen eine periphere Zielstruktur der reversiblen peripheren Neuropathie darstellen [117]. Die Schwann-Zelle ist eine spezielle Form einer Gliazelle. Sie bildet eine umhüllende und

stützende Schicht, die das Axon einer Nervenzelle im peripheren Verlauf umgibt und bei markgeschützten Fasern durch eine Myelinscheide elektrisch isoliert [118]. Es wurde postuliert, dass die Stimulation der PDC- und Atmungskette durch DCA in glykolytischen Schwann-Zellen unkompensierten oxidativen Stress durch erhöhte ROS-Produktion verursacht. Dies kann zum Zellsterben führen [117]. Kommt es zu einer Schädigung der Myelinscheide, werden auch die darunterliegenden Nerven geschädigt. Das führt zu einer gestörten Signalweiterleitung und neurologischen Ausfallerscheinungen [118].

1.3 Zielsetzung

1.3.1 Das humane ösophageale Plattenepithelkarzinom

Um gegenläufigen Prozesse, die sich aus der Wiederherstellung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) ergeben, und dadurch die Effizienz der pharmakologischen Strategie für die Behandlung von Krebsarten stören, zu untersuchen, wurde ein humanes ösophageales Plattenepithelkarzinom (ESCC)-Modell gewählt. Speiseröhrenkrebs ist die sechsthäufigste krebserkrankte Todesursache weltweit und stellt daher eine große globale gesundheitliche Herausforderung dar. Die beiden wichtigsten Subtypen von Speiseröhrenkrebs sind das ESCC und das Adenokarzinom der Speiseröhre (EAC), die epidemiologisch und biologisch unterschiedlich sind. ESCC machen 70 % aller Fälle von Speiseröhrenkrebs weltweit aus und sind in Asien, Afrika und Südamerika sehr verbreitet. Das EAC ist in den Industrieländern, wie Amerika und Europa, häufiger anzutreffen als in den Entwicklungsländern [119]. Eine Diagnose und Behandlung im frühen Stadium ohne Lymphknotenbefall und Metastasierung kann häufig durch endoskopische und chirurgische Resektion behandelt werden und präsentiert eine hohe 5-Jahres-Überlebensrate von 45,2 %. Kommt es zur Ausbreitung des Tumors über die Lymphknoten bis zu distalen Metastasen, sinkt die Prognose rapide auf 25 % beziehungsweise 15 % [120].

Solide Tumore, wie auch Ösophaguskarzinome, haben eine erhöhte HA-Produktion, die eine tumorprotektive Wirkung hat [121, 122]. Das Ösophagus-*in-situ*-Karzinom exprimiert HA auch in den Zellschichten nahe der Luminaloberfläche, in Regionen, die normalerweise keine Expression zeigen. Im Laufe des Tumorwachstums steigt die HA-Expression an und bleibt auch während der Progression und Metastasierung bestehen. Zusätzlich kann eine vermehrte HA-Konzentration im stromalen Gewebe gemessen werden [123]. Frühere *in vitro*-Untersuchungen demonstrierten, dass ESCC-Zellen

maßgeblich von der HA-Synthese abhängig sind, um den proliferativen Phänotyp zu erhalten [124].

DCA wurde bereits in mehreren Phase-I-Studien zur Beurteilung der Sicherheit und zur Dokumentation eines möglichen Ansprechens auf die Behandlung bei fortgeschrittenen soliden Tumoren untersucht. Die Behandlung zeigte aber aufgrund der Nebenwirkungen oder der niedrigen Dosen keinen konsistenten Effekt auf Tumorprogression und Krankheitsverlauf [110, 112]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass solide Tumore in Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Scans von Patienten vermehrt Glukose aufnehmen [125]. Dies korreliert mit einer Akkumulation des Glukose-Transporters, GLUT, die *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden konnte [126]. Zusätzlich sind in Ösophaguskarzinom-Zellen die Zielstruktur des DCAs, PDK, und das zentrale Enzym der Laktatproduktion in der Glykolyse, LDHA, erhöht. Beide Enzyme wurden bereits als prognostischer Marker für die Überlebensprognose von Patienten identifiziert [127-129].

Wichtig bei Untersuchungen zur Behandlung von Tumoren über die Inhibition der EZM ist die richtige Wahl des Versuchsmodells. Gewebe und Organe sind dreidimensional (3D). Um ihre Entstehung, Funktion und Pathologie zu verstehen, werden jedoch oft zweidimensionale (2D) Zellkulturanalysen oder Tiermodellssysteme verwendet. Arbeiten in Standardzellkulturen haben viele wichtige konzeptionelle Fortschritte gebracht. Dennoch können sich Zellen, die in flachen 2D-Gewebekulturen gezüchtet werden, in ihrer Morphologie, ihren Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und ihrer Differenzierung von denen in physiologischeren 3D-Umgebungen erheblich unterscheiden [130, 131]. *In vitro*-3D-Gewebemodelle bieten einen Ansatz, der die Lücke zwischen traditionellen Zellkultur- und Tiermodellen schließt [130]. So präsentierten zum Beispiel Prostatakrebszellen, die in einer 3D-Kultur kultiviert wurden, nachweisbare realistischere Tumoreigenschaften, einschließlich einer verbesserten Tumorprogression und eines erhöhten metastatischen Potenzials als in 2D-Modellen [132]. Ebenso demonstrierten Osteosarkomzellen unterschiedliche metabolische Eigenschaften, wenn sie in einer Monoschicht oder als Tumorspheroide kultiviert wurden [133]. Durch die Nachahmung von Merkmalen der *in vivo*-Umgebung und die Nutzung der gleichen analytischen Methoden wie bei der Untersuchung von 2D-Zellkulturen bieten diese 3D-Modelle einzigartige neue Perspektiven für Tumoranalysen.

1.3.2 Verbindung von Metabolismus und Hyaluronsäure-Synthese

Einige Verbindungen zwischen dem Warburg-Effekt und der Hyaluronsäure-Synthese in Krebszellen sind bereits bekannt. So zeigt sich bereits früh in der Wundheilung, wenn Blut und Sauerstoffversorgung abnehmen, ein ansteigender Laktat Spiegel als Endprodukt der Glykolyse ebenso wie eine erhöhte stromale Hyaluronsäure-Konzentration [134]. Ebenso kann die gesteigerte Hyaluronsäure-Produktion der Stromalen Fibroblasten eine Reaktion auf die Krebszell-Laktat-Sekretion sein. Um dies zu testen, wurden Fibroblasten in Gegenwart von Laktat kultiviert. Mit zunehmendem Laktat wurden höhere Hyaluronsäure-Konzentrationen und ein Anstieg der CD44-Expression in den Stromazellen gemessen [135]. Auch der HA-Rezeptor CD44 hat eine enge Verbindung zum intrazellulären Stoffwechsel. So wurde beobachtet, dass CD44 direkt mit dem glykolytischen Phänotyp von Krebszellen korreliert und diesen sogar verstärkt. Dabei konnte erhöhter CD44-Mangel den Stoffwechselfluss zur mitochondrialen Atmung verschieben und dadurch gleichzeitig den Eintritt in die Glykolyse hemmen. Wenn CD44 fehlt, erhöhen sich die Metaboliten der mitochondrialen Respiration, wie Malat und Zitat. Aus der vermehrten Aktivierung der Mitochondrien resultiert eine Akkumulation der mitochondrialen ROS-Produktion. Daher wäre eine Inhibition dieses Rezeptors eine alternative Anti-Tumorthherapie [136].

HA wird in der Zelle hauptsächlich aus den HA-Vorläufern UDP-GlcUA und UDP-GlcNAc synthetisiert, die in den ersten Schritten der Glykolyse aus Glukose entstehen (1.1.2.1). So zeigte sich, dass die HA-Synthese einerseits von der Glukose-Verfügbarkeit und -Aufnahme und andererseits von der Aktivität anderer Glukose-verbrauchender biochemischer Metabolisierungswege wie der Glykolyse abhängt [137-139]. Eine Steigerung der UDP-GlcUA-Konzentration durch die Überexpression von UDP-Glc-Dehydrogenase erhöhen die HA-Produktion [50]. Die zelluläre Menge von UDP-GlcNAc ist in der Regel drei- bis siebenmal höher als der von UDP-GlcUA und auch die Affinität der HA-Synthasen ist deutlich höher zu UDP-GlcNAc [16]. Daher reagieren Zellen leicht auf die Depletion von UDP-GlcNAc mit einer Hemmung der HA-Synthese [140]. Auf die gleiche Weise wie die Reduktion des UDP-GlcNAc-Pools die HA-Synthese hemmt, verhindert sie auch die HAS3-Lokalisierung in der Plasmamembran. So reguliert der HA-Vorläuferpool die Verfügbarkeit der HA-Synthasen an der Plasmamembran. Zusammengefasst produzieren Zellen, die in Abwesenheit von Glukose kultiviert werden, sehr wenig HA [138].

Eine Inhibition des Warburg-Effektes könnte als einen direkten Effekt auf die Tumormatrix, oder noch spezifischer auf die Hyaluronsäure, haben. Eine

Kombinationstherapie, die eine Hemmung beider tumorprotektiven Signalwege bewirkt, könnte also eine effektive Therapieoption darstellen.

1.3.3 Fragen und Ziele

Obwohl Voruntersuchungen zeigten, dass DCA das Wachstum bestimmter Tumore in Tierversuchen und in Zellkulturen verlangsamen kann, wird DCA bisher nur in klinischen Studien benutzt und ist für den klinischen Einsatz noch nicht zugelassen [109-111]. Die Effizienz leidet unter den auftretenden Nebeneffekten, die nur durch Intervall- oder Niedrigdosierung verhindert werden können. Tumorpatienten zeigten jedoch in ersten klinischen Studien ein gutes Ansprechen auf die Behandlung mit DCA und eine Kombination mit anderen Chemotherapeutika könnte DCA zu einer effektiven Tumorbehandlung machen. Daher wurden die folgenden Ziele für diese Arbeit definiert:

- Die Identifikation eines Resistenzmechanismus der Krebszellen, der die Effektivität von DCA hemmt.

- Die Analyse des mechanistischen Hintergrunds zwischen dem Resistenzmechanismus und der Wirkungsweise von DCA

- Die Untersuchung einer Kombinationstherapie von DCA und einem Inhibitor, der den Resistenzmechanismus (EZM) hemmt, der die Wirkung von DCA verstärkt und synergistisch wirkt.

- Der Vergleich der Effektivität der Kombinationsbehandlung in 2D- und 3D-Zellkulturmodellen.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsmittel

2.1.1 Substanzen

Substanzen wurden von der Firma Sigma-Aldrich erworben falls nicht anders spezifiziert.

2.1.2 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blot-System	PerfectBlue Semi-Dry	Peqlab
Echtzeit Metabolismus Messgerät	Seahorse XFe96 Analyzer	Agilent
Echtzeit-PCR System	StepOnePlus System	Applied Biosystems
Elektrophorese-System	mini-PROTEAN 3, PowerPac 200 + 300	Bio-Rad
Fluoreszenz-Scanner	LI-COR Odyssey CLx	LI-COR
Mikroskop, invers	Axio Observer.Z1	Zeiss
Mikroplatten	Microplate Reader Synerge™	Bio-Tek
Spektrophotometer	Mx	
RNA-Spektrometer	Nanodrop-1000	Peqlab

2.1.3 Hersteller

Tabelle 2: Herstellerverzeichnis

Hersteller	Hauptsitz
Abcam	Cambridge, UK
Analytik Jena	Jena, Deutschland
Applied Biosystems	Fostercity, CA, USA
Bio-Rad	Hercules, CA, USA
BRAND	Wertheim, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Corgenix Medical Corporation	Broomfield, CO, USA
DSMZ	Braunschweig, Deutschland

GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Graphpad Software	La Jolla, CA, USA
Greiner BIO-ONE	Frickenhausen, Deutschland
Leica	Wetzlar, Deutschland
LI-COR	Lincoln, NE, USA
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Promocell	Heidelberg, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA
VWR Chemicals	Rador, PA, USA
Carl Zeiss MicroImaging GmbH	Oberkochen, Deutschland

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung

Humane ESCC-Zellen Kyse-410 (ACC 381, DSMZ) und humane dermale Fibroblasten (NHDF)-Zellen (C-12300, Promocell) wurden für alle Versuche verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 GlutaMAX™ (*Roswell Park Memorial Institute 164 Medium*, Thermo Fischer Scientific) oder DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Thermo Fischer Scientific) unter Zusatz von 10 % Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Thermo Fischer Scientific) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mittels 0,5 % Trypsin/EDTA-Lösung (TE, Thermo Fischer Scientific) abgelöst und in einer Dichte von 1x10⁵ Zellen/75 cm² ausgesät.

2.2.2 Quantifizierung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wurden die Zellen mittels TE abgelöst und in Vollmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension bei einer Rotationsgeschwindigkeit (x g) von 300 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und das isolierte Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden 1:1 mit 0,4 % Trypanblau (Thermo Fischer Scientific) verdünnt und die Zellzahl mittels Countess-Zellzähler (Thermo Fischer Scientific) bestimmt. Zur Bestimmung der Wachstumssrate wurden 5x10⁴ KYSE-410 oder NHDF in eine 6-Loch-Zellkulturplatte (Greiner BIO-ONE) ausgesät und täglich zeitgleich über einen Zeitraum von 72 Stunden (Std) quantifiziert.

2.2.3 Sphäroidbildung und Kultivierung

Neben der 2D-Zellkultivierung wurde auch ein 3D-Modell verwendet. Um Sphäroide zu bilden, wurden 2D-Kulturen analog zu 2.2.1 trypsinisiert und anschließend gezählt. Je 5×10^3 KYSE-410-Zellen/Loch wurden mittels 200 μ l RPMI Vollmedium in adhäsionsfreien 96-Loch-Platten (BRAND) kultiviert. Die Platte wurde für 10 min bei 600 x g zentrifugiert und 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine stabile sphäroide Struktur zu bilden. Ab Tag 4 wurde das Medium alle 3 Tage gewechselt, wobei 180 μ l Altmedium entnommen und durch frisches Medium ersetzt wurde.

2.2.4 Sphäroidvolumenbestimmung

Um die Effektivität der Behandlung der Sphäroide zu bestimmen, wurden ab Tag 4 der Kultivierung die 3D-Zellkulturen mittels Durchlichtmikroskopie dokumentiert. Dabei wurde an Tag 0 (Tag 4 der Kultivierung), 3, 7 und 10 mittels 5x-Objektiv des Zeiss Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) Aufnahmen der Sphäroide im Durchlichtkanal gemacht. Der Durchmesser der 3D-Kulturen wurde mithilfe der AxioVision Software Zen Version 6.1.7601 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) ermittelt. Um das Volumen einer Kugel zu bestimmen, wurde die Formel $V = 1/6 \cdot \pi \cdot d^3$ verwendet.

2.2.5 Stimulation von 2D und 3D-Kulturen

Zur Untersuchung der Reaktion von KYSE-410- oder NHDF-Zellen auf die Behandlung von DCA und 4-MU wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/cm² in 6/12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Zur Zellzyklus-Synchronisierung wurde das Vollmedium (10 % FCS) nach 24 Std durch RPMI/DMEM ohne FCS ersetzt. Nach weiteren 24 Std wurden die Zellen mit DCA und 4-MU stimuliert. DCA wurde in einer Konzentration von 10, 20 und 40 mM hinzugegeben, wobei 100 und 300 μ M 4-MU verwendet wurden. Die Zellen wurden entweder mit einer einzelnen Substanz oder einer Kombination von beiden über 72 Std inkubiert und anschließend weiter analysiert.

Neben der 2D-Zellkultur wurden auch die Sphäroide mit beiden Substanzen behandelt. Hierbei wurden die Sphäroide nach dem beschriebenen Protokoll hergestellt und für 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 4 wurden die 3D-Kulturen entweder mit Einzelsubstanzen (20 mM DCA oder 300 μ M 4-MU) oder einer Kombination von DCA und 4-MU (20 mM DCA und 300 μ M 4-MU) stimuliert und über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet. Je Behandlungsgruppe wurden bis zu 24 Sphäroide angesetzt und analysiert.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Western-Blot-Analyse

Zur Quantifizierung der phosphorylierten und dephosphorylierten Form des Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP) Proteins als Marker der Apoptose oder zur Bestimmung der Gesamtheit der O-GlcNAcylierten Proteine in KYSE-410-Zellen wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Die ESCC-Zellen wurden kultiviert und mit DCA und/oder 4-MU stimuliert. Nach 72-stündiger Inkubationszeit wurden die Proben in RIPA-Puffer (NaCl 150 mM; Tris-HCl 25 mM; NP40 1 %; Natriumdesoxycholat 1 %; Natriumfluorid 5 mM; PMSF 1 mM; Natriumorthovanadat 1 mM) aufgenommen und unter Zugabe von Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren lysiert. Ein 5-fach Laemmli- β -Mercaptoethanol-Puffer (Tris-HCl 100 mM; 25 % Glycerol; Mercaptoethanol 8 %; 5 % SDS; Bromphenolblau 0,025 %) wurde zugegeben und die Lysate für 10 min auf 95 °C erhitzt. Die Proteine wurden mittels der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfat*, SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach ihrer Größe getrennt. Hierfür wurde ein 5 %-Sammelgel und ein 8 %- oder 10 %-Trenngel verwendet (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 3, 8 % für O-GlcNAc und 10 % für PARP).

Tabelle 3: Zusammensetzung Sammel- und Trenngel

Substanz	5 %-Sammelgel [ml]	8 %-Trenngel [ml]	10 %-Trenngel [ml]
H ₂ O	3,263	3,970	4,300
40 % Acylamid	0,563	1,500	3,000
1 M TRIS/HCl (pH 6,5)	0,563	-	-
1,5 M TRIS/HCl (pH 8,58)	-	1,875	2,500
10 % SDS	0,045	0,075	0,100
10 % APS	0,045	0,075	0,100
TEMED	0,005	0,005	0,006

Nach der Trennung der Proteine bei einer Spannung von 120 V wurden diese mittels der halbtrockenen (*semi-dry*) Elektroblotting-Methode vom Acrylamid-Gel auf eine 0,2 μ m Whatman Nitrocellulose Membrane (GE Healthcare) übertragen. Die Membran wurde für 1 Stunde in einer 5 %-Bovines-Serumalbumin (BSA)-Blockierlösung in TBS/T (*Tris-puffered saline / Tween 20* (0,1 %)) blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Anschließend wurde diese mit einer 1:1000 Primärantikörper-Verdünnung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Der entsprechende Zweitantikörper wurde zu 1:5000 in TBST/T verdünnt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) auf die Membran gegeben. Die genaue Auflistung der Antikörper ist in Tabelle 4 **und**

Tabelle 5 aufgeführt. Mittels des *Odyssey infrared imaging system* (LICOR Biosciences) wurde die Membran gescannt, die Konzentration des Proteins bestimmt und auf die Signalstärke des Tubulins normalisiert.

Tabelle 4: Erstantikörper und spezifische Bindeproteine

Bezeichnung	Spezies	Katalognummer	Hersteller	Anwendung
EpCAM	Maus	MA5-12153	Thermo Fischer Scientific	IC
O-GlcNAc	Maus	ab2739	Abcam	WB, IC
HAbP	-	385911	Calbiochem	IC
PARP	Kaninchen	46D11	Cell Signaling Technology	WB
β-Tubulin	Maus	T7816	Sigma Aldrich	WB

IC = Immunzytochemie, WB = Western-Blot

Tabelle 5: Zweitantikörper

Bezeichnung	Spezies	Katalognummer	Hersteller	Anwendung
Anti-Maus IRDye 680	Ziege	926-32210	LICOR Bioscience	WB
Anti-Maus IRDye 800	Ziege	926,68020	LICOR Bioscience	WB
Anti-Kaninchen IRDye 680	Ziege	926-32211	LICOR Bioscience	WB
Anti-Maus Alexa Fluor 488	Ziege	A-11029	ThermoFischer	IC
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Ziege	A11034	ThermoFischer	IC
Streptavidin-Cy3	-	SA1010	Invitrogen	IC

IC = Immunzytochemie, WB = Western-Blot

Tabelle 6: Fluoreszenz-Farbstoff

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller	Anwendung
Calcein AM	206700	Calbiochem	LF
CellEvent Caspase-3/7 GreenDetectionReagent	C10423	Life Technologies	LF
Ethidium Homodimer	46043	Sigma	LF
Hoechst 33342	H3570	Invitrogen	IC, LF

IC = Immunzytochemie, LF = Lebendzell-Färbung

2.3.2 Immunzytochemie

KYSE-410-Zellen wurden für immunzytochemische Färbungen in 12-Lochplatten auf Deckgläsern ausgesät, kultiviert und stimuliert. Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit mit DCA und/oder 4-MU wurden die Zellen mit einer 37 °C warmen Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend für 20 min bei RT in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Für die Hyaluronsäure-Bindeprotein (HAbP)-Färbung wurde eine spezialisierte Fixierlösung verwendet: PBS mit 4 % PFA, 70 % Ethanol und 0,5 % Essigsäure. Alle Färbungen wurden mittels einer 5 %-BSA-Lösung für 1 Stunde bei RT blockiert, um eine unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren. Für die O-GlcNAc-Färbung wurden die Zellen gleichzeitig mit Triton X-100 permeabilisiert (O-GlcNAc Blockierlösung: PBS mit 10 % Ziegen Serum, 0,3 M Glycin, 1% BSA und 0,1 % Triton X-100). Der Erstantikörper (siehe Tabelle 4) wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und durch den Zweitantikörper (siehe Tabelle 5) sichtbar gemacht. Dafür wurden die Zellen 1 Stunde lang bei RT mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Objektträger mit VectorShield (Vector Laboratories) eingedeckt und mittels Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) mikroskopiert. Für die Auswertung wurde die Software ImageJ (Version 1.52) verwendet und die Intensität pro Fläche (IntDen) gemessen. Die IntDen wurde dann auf die Anzahl der Zellkerne normalisiert.

2.3.3 HAbP-Immunaффinitäts-Assay

Die Konzentration der Hyaluronsäure im Überstand wurde mittels eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-ähnlichen immunoturbidimetrischen *Hyaluronsäure Acid Test* (Corgenix) nach Herstellerangaben ermittelt. Hierfür wurden 5×10^4 Zellen in eine 12-Lochplatte ausgesät und für 72 Std mit DCA und/oder 4-MU behandelt. Der Überstand wurde entnommen und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden durch 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung für 15 min bei RT lysiert und

anschließend wurde die Proteinkonzentration des Lysats bestimmt. Die ermittelte HA im Überstand wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

2.3.4 Glukose-6-Phosphat-Bestimmung

Die Glukose-6-Phosphat (G-6-P)-Konzentration von KYSE-410-Zellen wurde mittels eines kolorimetrischen *Assay Kits* (MAK014) vermessen. Die Zellen wurden nach dreitägiger Stimulation mit Einzel- oder Kombitherapien in 300 µl eiskaltem PBS homogenisiert und daraufhin für 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert. 50 µl des Lysats wurden nach Herstelleranleitung analysiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels des Mikroplatten-Spektrophotometers (Bio Tek) gemessen und mithilfe einer Standardkurve (0-10 nmol) konnte die intrazelluläre G-6-P-Konzentration berechnet werden. Normalisiert wurden die errechneten Werte auf die gemessene Gesamt-Proteinkonzentration der Zellen.

2.3.5 Acetyl-CoA-Bestimmung

Ein kolorimetrisches Acetyl-Koenzym-A-Assay-Kit (MAK034) wurde verwendet, um die intrazelluläre Konzentration von Acetyl-CoA in KYSE-410-Zellen zu quantifizieren. Wie zuvor bei der G-6-P-Bestimmung wurden die Zellen in PBS aufgenommen und lysiert. Die Proben wurden nach Herstellervorgaben analysiert und anschließend zur Proteinkonzentration normalisiert. Der chemische Inhibitor SB-204990 hemmt die ATP-Zitrat-Lyase (ACL), die das zytosolische Zitrat zu Acetyl-CoA umwandelt, und wurde hier als negative Kontrolle für die Acetyl-CoA-Messung verwendet [141]. Die Zellen wurden mit 30 µM Inhibitor SB-204990 in Kombination mit 40 mM DCA für 72 Std inkubiert und die intrazelluläre Fraktion analysiert.

2.3.6 UDP-Zucker-Extraktion

1x10⁶ KYSE-410-Zellen wurden in einer T175-Flasche ausgesät und nach Standardprotokoll stimuliert und inkubiert. Nach 72 Std wurde das Medium verworfen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden 5 ml eiskalte PBS auf die Zellen gegeben, die mit einem Gummischaber vom Flaschenboden gelöst wurden. Die Zelllösung wurde dann für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und die Zellen in 1 ml Ethanol (75 %) aufgenommen. Mittels Ultraschall-Sonifikation wurden die Zellen aufgeschlossen und daraufhin für 10 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. 50 µl des Zelllysats wurden isoliert und für eine DNA-Quantifikation genutzt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand zur weiteren Analyse gefriergetrocknet und bei -80 °C gelagert. Envi-Carb (#34998, SUPELCO)-Säulen wurden zur Extraktion der UDP-Zucker aus dem Zelllysats verwendet. Die Säulen wurden vorab mit 1 ml 80 %

Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure und *Ultrapure* destilliertem Wasser (MilliQ) bei je 100 x g für 30 s gewaschen. Die getrockneten Proben wurden in 2 ml 10 mM Ammonium-Bikarbonat-Puffer rekonstituiert und auf die Säulen geladen. Nach einem 10-minütigen Zentrifugationschritt bei 20 x g wurden die Säulen mit je 700 µl MilliQ, 80 % Acetonitril und 50 mM Triethylammonium Acetat (TEAA, pH 7) bei 100 x g für 1 min gespült. Die isolierten UDP-Zucker wurden mittels 1 ml 25 % Acetonitril in 50 mM TEAA bei 100 x g für 5 min eluiert anschließend gefriergetrocknet und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.3.7 Fluorophor-assistierte-Kohlenhydrat-Elektrophorese

Die zuvor isolierten UDP-Zucker wurden dann nach Barnes [142] durch eine Fluorophor-assistierte-Kohlenhydrat-Elektrophorese (FACE) mittels des Fluoreszenzfarbstoffes 2-Aminoacridon (AMAC) quantifiziert. Um die einzelnen Banden den richtigen Zuckern zuzuordnen, wurde eine Standardmischung hergestellt aus einer Kombination von 1 µg/ml je GalNAc und GlcNAc, 6 µg/ml Glukose und 3µg/ml GlcUA. Sowohl einzelne Substanzen als auch die Mischung aller Standards wurden zeitgleich mit den Proben analysiert. Die Aufnahmen wurden mittels UVP ChemStudio (Analytik Jena) Bildgebungssystem angefertigt und daraufhin die Signalstärke mit der Software Vision Works (Analytik Jena) quantifiziert. Die Ergebnisse wurden auf die DNA-Konzentration der jeweiligen Proben normalisiert, die mit dem Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen) bestimmt wurde.

2.3.8 Sphäroid-Färbungen

2.3.8.1 Lebendzell-Toxizitätsanalyse

Die 3D-Kulturen wurden analog zu 2.2.3 etabliert und stimuliert. Nach 10-tägiger Inkubation mit DCA und/oder 4-MU oder siRNA wurden die Sphäroide mit einer Mischung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe, wie von Sirenko beschrieben [143], gefärbt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurden die 3D-Kulturen mit 2 µM Calcein AM (Invitrogen; Proliferationsmarker) und 3 µM Ethidium Homodimer-1 (EthD) (Invitrogen; Zelltodmarker) inkubiert. Zur Identifizierung apoptotischer Zellen wurde der Farbstoff *CellEvent™ Caspase-3/7 Green* (7,5 µM; Invitrogen) verwendet (Tabelle 6). Zusätzlich wurden alle Sphäroide mit 33 µM Hoechst 33342 (Life Technologies) gegengefärbt. Alle Farbstoffe wurden in PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und je 100 µl auf eine 3D-Kultur gegeben. Die Zellen wurden dann für 3 Std im Dunkeln bei 4 °C inkubiert und anschließend mit dem Axio Observer.Z1 mikroskopiert.

2.3.8.2 Fluoreszenzfärbung von Hyaluronsäure in Sphäroiden

10 Tage alte Sphäroide wurden für eine Stunde mit 4 % PFA fixiert und anschließend in eine 1,2 % Agarose-destilliertes Wasser-Mischung gegeben. Überschüssige Agarose wurde nach dem Aushärten mit einem Skalpell entfernt und die Blöcke mit dem enthaltenen Mikrogewebe mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurden diese in Paraffinwachs eingebettet und mithilfe eines Rotationsmikrotoms (Leica) in 5 µm Schnitte geschnitten. Die HA-Konzentration der Schnitte wurde mittels HAbP bestimmt. Dafür wurden die zu färbenden Schnitte mittels dreifacher 15-minütiger Roticlear (Carl Roth)-Inkubation und anschließend mit einer absteigenden Ethanol-Reihe (Absolut, 96 %, 70 %; VWR) entparaffiniert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden vorhandene Biotin-Strukturen mit einem Avidin/Biotin-Block Kit (Thermo Fischer) nach Herstellerangaben blockiert. Zusätzliche wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer 10 % FCS und 2 % BSA-Lösung für 1 Stunde bei RT blockiert. Zur Detektion der ESCC wurde ein Antikörper gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM, siehe

Tabelle 4) verwendet und zusammen mit HAbP in einer Verdünnung von je 1:200 in 1 % BSA in PBS über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde mittels Alexa Fluor 488 und Streptavidin-Cy3 (siehe

Tabelle 5) in einer 1:200-Verdünnung in PBS für 1 Stunde bei RT angefärbt. Zusätzlich wurden alle Schnitte mit Hoechst 33342 gegengefärbt, mit VectorShield eingedeckt und mittels Axio Observer.Z1 mikroskopiert. Die Intensität pro Fläche (IntDen) wurde gemessen, auf die Zellkernzahl normalisiert und relativ zur Kontrolle angegeben.

2.3.9 Saure Phosphatase-Bestimmung

Die saure Phosphatase (APH)-Analyse misst die Zellvitalität, indem die zytosolische Phosphatase Aktivität gemessen wird [144]. Die Hydrolyse von p-Nitrophenyl-Phosphat zu p-Nitrophenol wird durch intrazelluläre Phosphatase in lebenden Zellen katalysiert. Die Absorption bei 405 nm ist direkt proportional zu der Anzahl an funktionellen Zellen. Die APH-Bestimmung kann bei 2D- und auch 3D-Kulturen verwendet werden. Nach der abschließenden Volumenbestimmung nach 10-tägiger Behandlung wurden je 16 3D-Kulturen mittels dieser Analyse untersucht. Dafür wurde die 96-Lochplatte für 10 min bei 400 x g und RT zentrifugiert und anschließend mit PBS gewaschen. Dabei wurden 160 µl des Überstandes verworfen und durch dieselbe Menge PBS ersetzt. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Volumen des Überstandes auf 100 µl

verringert. Daraufhin wurden 100 µl des APH-Assay-Puffers (0,1 M Natriumazetat und 0,1 % Triton X-100 in destilliertem Wasser) in jedes Loch zugegeben und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl einer 1 M NaOH-Lösung hinzugefügt, gemischt und nach 10 min die Absorption bei 405 nm mithilfe des Mikroplatten-Spektrophotometers (Bio-Tek) gemessen.

2.3.10 Proteinbestimmung der Zelllysate

Für eine Proteinbestimmung wurden die Zellen in eiskaltem PBS lysiert und deren Proteinkonzentration mittels Farbumschlag von Bicinchoninsäure (BCA) mit einem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde ein BSA Standard (2 mg/ml) verwendet und in einer Standardreihe von 25 bis 2.000 µg/ml vermessen. Je 25 µl des Standards oder des Zelllysats wurden mit 200 µl einer Messlösung (50:1 Reagenz A zu B) in einer 96-Lochplatte vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption mittels des Mikroplatten-Spektrophotometers analysiert.

2.4 Molekularbiologische Techniken

2.4.1 Genexpressionsanalyse

2.4.1.1 RNA-Isolation und reverse Transkription

Die Gesamt-RNA der Zellen wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert [145]. Dazu wurden die Zellen in 1 ml PqGOLD TriFast™ (PEQLAB Biotechnologie GmbH) lysiert und über Nacht bei 20 °C gelagert. Die Proben wurden am Folgetag aufgetaut und anschließend mit 200 µl Chloroform (VWR Chemicals) versetzt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde die obere wässrige Phase entnommen und zu gleichen Teilen mit 2-Propanol (VWR Chemicals) vermengt. Die RNA wurde über Nacht bei -20 °C gefällt. Diese wurde durch eine Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 x g für mindestens 45 min sedimentiert. Das entstandene Pellet wurde mit 75 % (V/V) Ethanol (VWR Chemicals) gewaschen, getrocknet und in 20 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) bei 260 nm bestimmt. 1 µg der isolierten RNA wurde durch reverse Transkription mithilfe des *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben zu *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben.

2.4.1.2 Quantitative *Realtime*-PCR

Die hergestellte cDNA wurde mittels *quantitative Realtime-polymerase chain reaction* (qPCR) im *Applied Biosystems 7300 Real-Time-PCR System* (Applied Biosystems) und dem *StepOnePlus™ Real-Time-PCR System* (Life Technologies) quantifiziert. Es wurde der *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen) entsprechend Herstellerprotokoll verwendet und mit dem folgenden Programm analysiert:

50 °C	2 min	} 40 Zyklen
95 °C	2 min	
95 °C	15 s	
60 °C	30 s	
72 °C	15 s	
60 °C	1 min	

Die zu identifizierenden-Sequenzen wurden mit den in Tabelle 7 genannten Primern erkannt und in Dublikaten vermessen.

Tabelle 7: qPCR Primer Sequenzen

Gene	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
HAS1	5'-TTCTTCAGTCTGGACTATA-TTGGGA-3'	5'-CCTGATCACACAGTAGAAATGG-3'
HAS2	5'-GTGGGGAAGAATCAAACATTTAAGA-3'	5'-AATGCATCTTGTTTCAGCTC-TTG-3'
HAS3	5'-GGAGGAGGATCCCCAAGTAG-3'	5'-CTGCTC-AGGAAGGAAATCCA-3'
HYAL1	5'-CCAAGGAATCATGTCAGGCCATCAA-3'	5'-CCCCTGGTACGTTTCAGG-3'
HYAL2	5'-GGCTTAGTGAGATGGACCTC-3'	5'-CCGTGTCAGGTAATCTTTGAG-3'
RHAMM	5'-GAATTTGAGAATTCTAAGCTTG-3'	5'-CCATCATACCCCTCATCTTTGTT-3'
CD44	5'-GCTATTGAAAGCCTTGCAGAG-3'	5'-CGCAGATCGATTTGAATATAACC-3'
LDHA	5'-TTCAGCCCGATTCCGTTACC-3'	5'-GGGTGCAGAGTCTTCAGAGAG-3'
PDK1	5'-ACCAAGACCTCGTGTGAGAC-3'	5'-TGCATCTGTCCCGTAACCCT-3'

Die Genexpression wurde anhand der erhaltenen Schwellenwerte (C_T) mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ zur endogenen Kontrolle berechnet. Die Durchführung der qPCR wurde unter anderem von Herrn Dr. Oliver Reiners ausgeführt [146].

2.4.2 Interferenz-RNA

Um die Expression bestimmter Gene zu hemmen, wurden KYSE-410-Zellen mit siRNA transfiziert. Diese siRNA war gegen *HAS3*, *CD44* oder *RHAMM* gerichtet, deren genaue Transkript-Varianten sind in Tabelle 8 zu finden. Hierfür wurde das herstellereigene Protokoll der Transfektion mit *Lipofectamine RNAiMAX* (Life Technologies) modifiziert. 12 pmol siRNA (2 μ M, FlexiTube, Qiagen) und 2 μ l der

Lipofectamine-RNAiMAX-Lösung wurden in einer 12-Loch-Zellkulturplatte in 200 µl antibiotika- und serumfreies Medium gegeben. Danach wurden jeweils 1×10^4 KYSE-410 in 1 ml serumhaltiges Medium hinzugegeben und bei Standardbedingungen kultiviert. Die Effizienz der Gen-Inhibition wurde nach 72-stündiger Inkubationszeit mittels qPCR verifiziert.

Tabelle 8: siRNA

Ziel-Gen	Transkript-Varianten (Bezeichnung, Nr.)	Qiagen-Bestellnummer
Kontrolle	-	SI03650318
HAS3	NM_001199280, NM_005329	SI00433895
CD44	NM_001202555, NM_001202556	SI00299705
RHAMM	NM_001142556, NM_001142557	SI02653196

2.4.3 Quantifizierung der Glykolyse und von Zitrat-Zyklus-Metaboliten mittels *High-Performance Liquid Chromatographie*

2.4.3.1 Proben-Aufbereitung für HPLC

1×10^5 KYSE-410-Zellen wurden in eine 6-Lochplatte ausgesät und nach Standardprotokoll stimuliert. Nach 3-tägiger Inkubation mit DCA und/oder 4-MU wurden die Zellen für die intrazelluläre Metabolitanalyse geerntet. Hierfür wurden die Zellen nach Standardprozedere mit TE abgelöst und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammern (BRAND) bestimmt. Je 7×10^5 KYSE-410 jeder Probe wurden für die Messung entnommen und alle auf ein Gesamtvolumen von 1 ml mit Vollmedium gebracht. Nach einer Zentrifugation bei $300 \times g$ für 5 min wurden die Zellen mit warmen ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation mit 100 µl *High-Performance Liquid Chromatographie* (HPLC)-Lysepuffer (1 mM CaCl_2 , 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 10 mM Tris pH 7.5) versetzt. Die Suspension wurde durch mehrmaliges Auf-und-Ab-Pipettieren vermischt und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Die ungelösten Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei $14.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min pelettiert und der entstandene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mithilfe von Perchlorsäure (PCA; VWR) wurden die Proben deproteinisiert, indem zu den 100 µl Zelllysate 250 µl eiskalte 10 %ige PCA-Lösung gegeben wurde. Nach einminütigem Vortexen und 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proteine als weißer Feststoff ausgefällt. Dieser Feststoff wurde durch Zentrifugation bei $14.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min isoliert und der Überstand für die HPLC-Messung isoliert. Für die extrazelluläre Metabolitmessung wurden 100 µl des Wachstumsmediums vor der Zellernte aus der 6-Lochplatte entnommen und ausschließlich deproteinisiert und analysiert. Je 100 µl der aufgereinigten Proben wurden für eine Messung in die HPLC injiziert.

2.4.3.2 HPLC Durchführung

Die Messung der extra- und intrazellulären Metaboliten mittels HPLC erfolgte wie durch Shurubor beschrieben [147] und wurde an das Model angepasst. Zur Analyse wurde ein HPLC UV/VIS (Thermo Fisher) mit einer C18-Säule (250 x 4,5 mm, 4 mm Partikelgröße; Macherey-Nagel) bei RT genutzt. Hierbei wurde ein 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer mit einer Flussrate von 0,9 ml/min verwendet. Die Absorption der Metaboliten wurde mit dem UV/VIS-Detektor bei 210 nm gemessen. Intrazellulär wurden die Metaboliten Pyruvat, Laktat und Malat vermessen, zusätzlich wurde die Laktatkonzentration in der extrazellulären Fraktion bestimmt. Mittels Standardsubstanzen der einzelnen Metaboliten konnte eine jeweilige Messsensitivität (siehe Tabelle 9) bestimmt werden.

Tabelle 9: Messbereiche der Metaboliten mittels HPLC

Standardsubstanz	Untere Messgrenze	Obere Messgrenze
Pyruvat	10 µM	400 µM
Laktat	500 µM	8 mM
Malat	100 µM	2 mM

2.4.4 Lebendzell-Metabolismus-Messung mittels Seahorse XFe96

Mittels Seahorse XFe96 (Agilent Technologies) wurde der Metabolismus von Lebendzellen anhand von Sauerstoffverbrauchsmessungen (*Oxygen consumption rate* (OCR)) und extrazellulären pH-Wert Messungen (*extracellular acidification rate* (ECAR)) analysiert. Dafür wurden am Tag vor der Messung 12×10^3 KYSE-410-Zellen in XFe96-Lochplatten (Agilent Technologies) im Standard Zellkulturmedium ausgesät. Am Tag der Analyse wurde das Medium gegen ein nicht gepuffertes RPMI-1940-Medium (Agilent Technologies) ausgetauscht, das mit 10 mM Glukose, 100 mM Pyruvat, 2 mM Glutamin und 5,0 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES) Puffer supplementiert wurde. Die Zellen wurden in diesem Medium für 1 Std bei 37 °C ohne Zugabe von CO₂ inkubiert und anschließend mit dem Seahorse XF *Mito Stress Test Kit*, *Glycolysis-Rate-Assay Kit* und dem *Mito-Fuel-Flex-Test* (Agilent Technologies) untersucht. Um die unmittelbare metabolische Reaktion der Zellen auf die Stimulation mit 20 mM DCA und/oder 300 µM 4-MU zu untersuchen, wurden die Substanzen durch das XFe96-Analysegerät nach 15-minütiger Basalmessung injiziert und für 35 min inkubiert und anschließend das Standardprotokoll der jeweiligen Kits gestartet.

2.4.4.1 Mito-Stress-Test

Mithilfe des Seahorse XF *Mito Stress Test Kits* (Agilent Technologies) wurde die mitochondriale Funktion unter dem Einfluss von DCA und/oder 4-MU im Detail untersucht. Die Messung der *Oxygen consumption rate* (OCR) gibt dabei Aufschluss über die basale Respiration, ATP-abhängige Respiration, über Protonen-Lecks, maximale Respiration, Überschusskapazität und nicht-mitochondriale-Respiration. Zunächst wurde eine Basalmessung der unstimulierten Zellen für 15 min durchgeführt und anschließend die Therapeutika injiziert und OCR über 35 min aufgezeichnet (siehe Abbildung 1). Nach dieser Inkubationzeit wurden die Zellen mit 1 μM Oligomycin, einem ATP-Synthase (Komplex V)-Inhibitor, behandelt und die OCR für 20 min detektiert. Durch Oligomycin kann die basale ATP-Konzentration in mitochondriale und nicht-mitochondriale Respiration unterteilt werden. Daraufhin wurden 0,5 μM *Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone* (FCCP) zugegeben und der Sauerstoffgehalt für 20 min gemessen. FCCP lässt den Protonengradienten der Mitochondrien kollabieren und deren inhibierendes Potenzial auf die Elektronen-Transportkette wird aufgehoben. Es kommt so zu einer größtmöglichen mitochondrialen Respiration. Aus der Differenz der maximalen und basalen Respiration kann die Überschusskapazität berechnet werden. Schließlich wird die gesamte mitochondriale Atmung durch die Inhibition von Komplex I und III gestoppt. Dies geschieht durch den Einsatz von 0,5 μM Rotenon und Antimycin A. Nach der vergangenen Injektion wird der Sauerstoffverbrauch über weitere 20 min detektiert und die einzelnen Messungen mittels der Wave Software (Version 2.4.0; Agilent Technologies) ausgewertet.

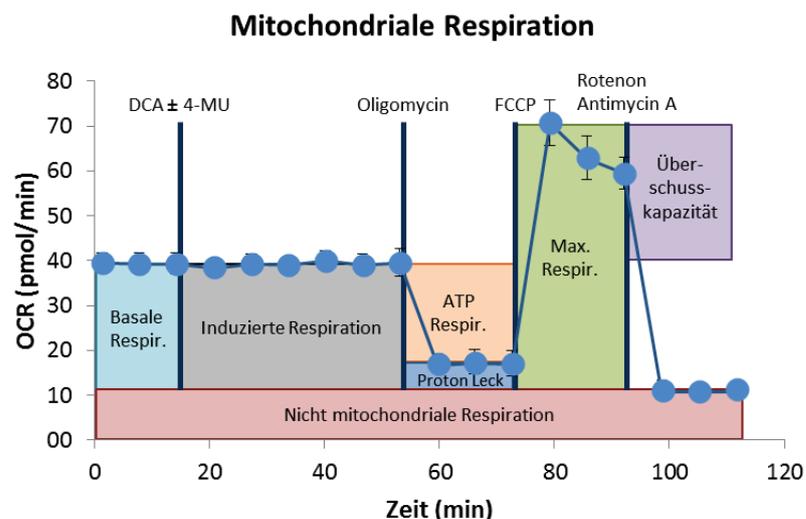


Abbildung 1: Mitochondriale Respirationsbestimmung mittels Seahorse
(angelehnt an Agilent Technologies, Inc. 2018 [148])

2.4.4.2 Glycolysis-Rate-Assay

Um den Anteil an glykolytischer Energieproduktion zu bestimmen, wurde ein *Glycolysis Rate Assay Kit* (Agilent Technologies) verwendet. Wie oben beschrieben wurde die OCR und die ECAR gemessen und daraus die glykolytische *Protonen Efflux Rate* (glykoPER) errechnet. Diese Rate beschreibt, wie viele Protonen durch die Glykolyse in das umliegende Medium ausgestoßen werden. Die Messung wurde, wie im *Mito Stress Test* mit einer basalen Bestimmung begonnen, anschließend mit DCA und/oder 4-MU stimuliert und weitere 35 min detektiert (siehe Abbildung 2). Um die mitochondriale Respiration zu eliminieren, wurden erneut 0,5 μ M Elektronentransportketten-Inhibitoren Rotenon und Antimycin A verwendet. Das überschüssige Pyruvat, das nun nicht mehr in den Mitochondrien verwendet wird, kann jetzt in der Glykolyse verbrannt werden. Es gibt dadurch Aufschluss über die kompensatorische Kapazität der Zellen, ATP über die Glykolyse herzustellen. 50 mM 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG), ein Glukoseanalogon, wurde auf die Zellen gegeben, um die Hexokinase kompetitiv zu hemmen und damit zu verifizieren, dass die gemessene Respiration ausschließlich glykolytischen Ursprungs ist.

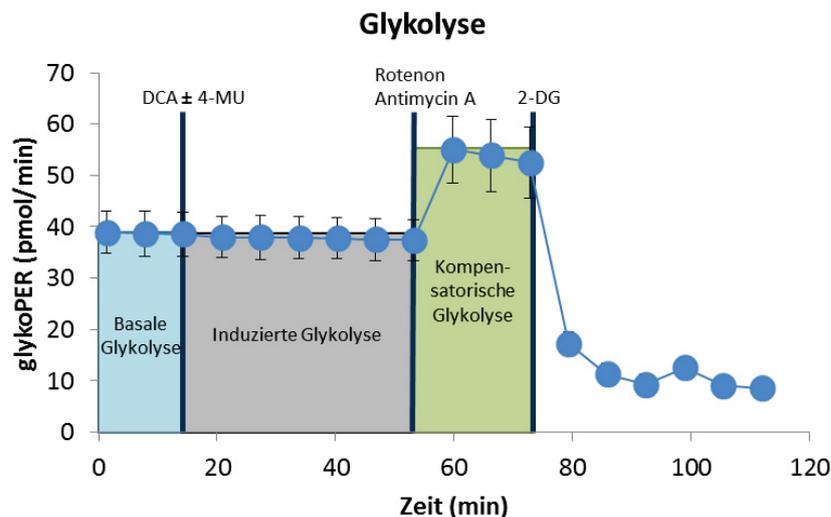


Abbildung 2: Glykolyse-Bestimmung mittels Seahorse

(angelehnt an Agilent Technologies, Inc. 2018 [149])

2.4.5 Ermittlung des Kombinationsindexes

Um eine mögliche synergistische Wirkungsweise von DCA und 4-MU zu untersuchen, wurde eine Methode nach Chou verwendet [150]. Zur Errechnung der Dosis-Wirkungskurven wurden die Zellen 3 Tage stimuliert und anschließend gezählt. Folgende Konzentrationen von DCA und 4-MU wurden hierfür verwendet:

DCA: 10, 20, 40 mM

4-MU: 100, 300, 500 μ M

Kombination: 100 μ M 4-MU + 10 mM DCA, 100 μ M 4-MU + 20 mM DCA, 100 μ M 4-MU + 40 mM DCA, 300 μ M 4-MU + 10 mM DCA, 300 μ M 4-MU + 20 mM DCA, 300 μ M 4-MU + 40 mM DCA

Mithilfe der CompuSyn-Software [151] wurde der Effekt der Behandlung relativ zur Kontrolle ausgewertet und zur Berechnung des Kombinationsindex (CI) herangezogen.

$$CI = (D_{\text{Kombi DCA}} / D_{\text{Mono DCA}}) + ((D_{\text{Kombi 4-MU}} / D_{\text{Mono 4-MU}})$$

(Dosis Kombination DCA / Dosis für den gleichen Effekt benötigte Monotherapie DCA) + (Dosis Kombination 4-MU / Dosis für den gleichen Effekt benötigte Monotherapie 4-MU)

Nach Chou werden CI-Werte von $\leq 0,9$ als synergistisch bewertet - mit einer Abstufung von geringem (0,9-0,85), moderatem (0,85-0,7), starkem (0,7-0,3) und sehr starkem (0,3-0,1) Synergismus. Werte zwischen 0,9 und 1,1 beschreiben einen additiven Effekt, und antagonistische Interaktionen zeigen einen CI Wert $> 1,10$.

2.5 Statistik

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software) durchgeführt und dargestellt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden Datensätze mit ausschließlich zwei Gruppen mittels t-Test analysiert. Datensätze aus mehr als zwei Gruppen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) und nachgeschaltetem *post hoc* Test nach *Tukey's multiple comparison* analysiert. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die Identifizierung von neuen synergistischen Strategien, um die Wirksamkeit von metabolischen Krebstherapien zu verbessern. Dabei wurde das Medikament DCA als zentraler Ansatz gewählt, da es als Angriffspunkt den aeroben glykolytischen Stoffwechsel in Krebszellen nutzt. Das Ösophaguskarzinom wurde hier als Modelltumorentität gewählt, da bis heute nur wenige effiziente Behandlungsstrategien existieren [152]. In früheren Untersuchungen wurde bereits HA in der Tumormikroumgebung als zentralen Faktor für die Tumorprogression in Ösophagus-Plattenkarzinomzellen identifiziert [124, 153].

3.1 DCA stimuliert die Hyaluronsäurematrix in ESCC-Zellen auf Produkt- und Transkriptionsebene

Als Voraussetzung für weitere Untersuchungen wurde zunächst der Einfluss einer DCA-Behandlung auf das HA-Matrixsystem untersucht. So wurde der extra- und perizelluläre HA-Gehalt quantifiziert und die transkriptionelle Regulation von Schlüsselgenen des HA-Matrixsystems in der ESCC-Zelllinie KYSE-410 als Reaktion auf DCA bestimmt.

3.1.1 Eine DCA-Behandlung von ESCCs führt zu einem Anstieg der peri- und extrazellulären HA-Konzentration

Auf Produktebene wurde die HA-Konzentration mittels ELISA-ähnlicher Immunaффinitätsmessung und HAbP-affinitätshistologischer Färbung ermittelt (0). Durch die Inkubation der ESCCs mit DCA kam es zu einem dosisabhängigen Anstieg der HA-Menge im Überstand (Abbildung 3A), wobei erst eine DCA-Konzentration von 20 mM zu einer signifikanten Erhöhung führte. Die perizelluläre HA-Fraktion wurde mittels einer Färbung durch HAbP dargestellt (Abbildung 3B). Diese Versuche verifizierten die Ergebnisse der ELISA-Messung, wobei die perizelluläre HA-Konzentration einen deutlicheren Anstieg zeigte als die HA-Menge im Überstand.

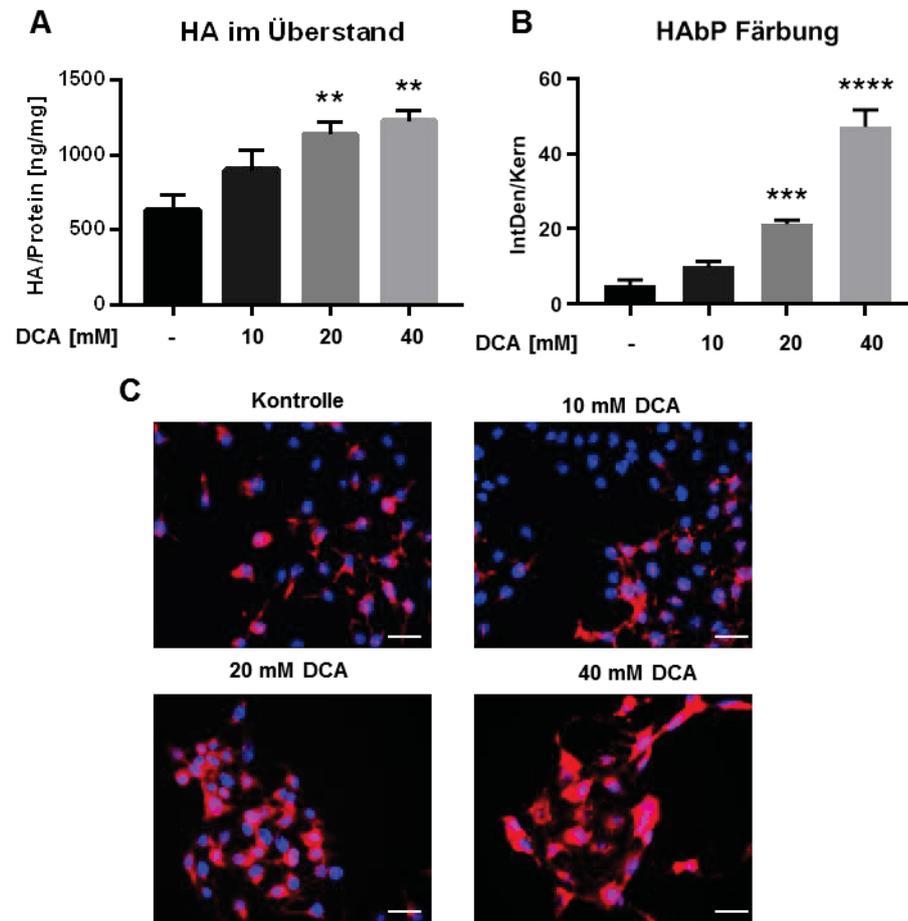


Abbildung 3: DCA erhöht die HA-Konzentration im Überstand und in der perizellulären Matrix

A Die HA-Konzentration wurde im Überstand mittels ELISA-ähnlicher Immunaффinitätsmessung nach 72-stündiger DCA-Behandlung mit 10, 20 und 40 mM gemessen. (n=6) **B, C** Die HAbP-Färbung diente zur Ermittlung der HA in der perizellulären Matrix (rot). Die Intensität wurde zur Zellzahl (blau, Hoechst) normalisiert (n=7, jedes n stellt eine gepoolte Analyse von 5 Replikaten dar). **C** Repräsentative Bilder nach 72-stündiger Inkubation, Maßstabsbalken: 100 μ m. Mittelwerte \pm SEM, one-way ANOVA, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,001 [154].

3.1.2 DCA erhöht die Transkription HA-assoziiierter Gene

Um den Effekt von DCA auf die HA-assoziierten Gene zu untersuchen, wurden die behandelten Zellen mittels qPCR auf die zentralen Gene des HA-Signalweges analysiert. Es konnte eine bis zu dreifache Erhöhung der beiden exprimierten HA-Synthasen (HAS2,3) nach DCA-Stimulation gemessen werden (Abbildung 4A). Die HA-Degradierungsproteine (HYAL1,2) wiesen einen dosisabhängigen Anstieg auf, der jedoch erst bei den höheren DCA-Dosen signifikant wurde (Abbildung 4B). RHAMM und CD44 sind HA-Rezeptoren, die bereits in früheren Arbeiten in enger Beziehung zu Tumorprogression und Prognose in Verbindung gebracht wurden [155]. Beide Rezeptoren wurden durch eine DCA-Inkubation bis zu drei- bzw. vierfach erhöht.

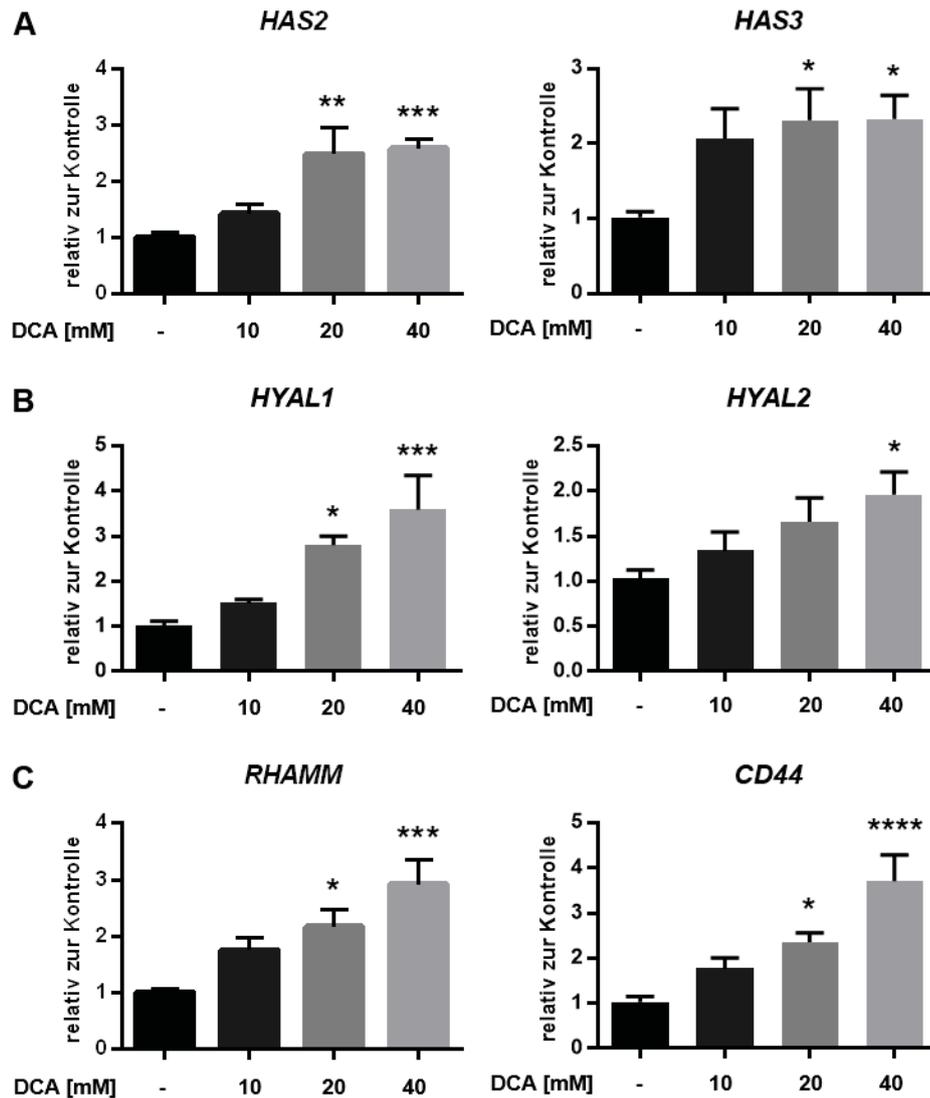


Abbildung 4: Die HA-Synthasen, Hyaluronidasen und HA-Rezeptoren werden auf Transkript-Ebene durch eine DCA-Behandlung hochreguliert

Die mRNA-Konzentration von **A** *HAS2* und 3, **B** *HYAL1* und 2 und **C** *RHAMM* und *CD44* wurde mittels qPCR in ESCCs gemessen. Zuvor wurden die Zellen mit 10, 20 oder 40 mM DCA über 72 Std behandelt. Mittelwerte \pm SEM, n=7, one-way ANOVA, *p<0,05, ***p<0,005, ****p<0,001 [154].

3.1.3 Die HA-Synthese wird durch 4-MU gehemmt

4-MU ist eine Substanz, die die Hyaluronsäure-Synthese kompetitiv hemmt [49]. Um den Effekt von 4-MU auf die HA-Synthese in ESCCs nachzuweisen, wurde die HA-Konzentration erneut im Überstand (Abbildung 5A) und in der perizellulären Matrix (Abbildung 5B) gemessen. Dabei konnte in beiden Versuchen jeweils eine Reduktion von ca. 50 % beobachtet werden.

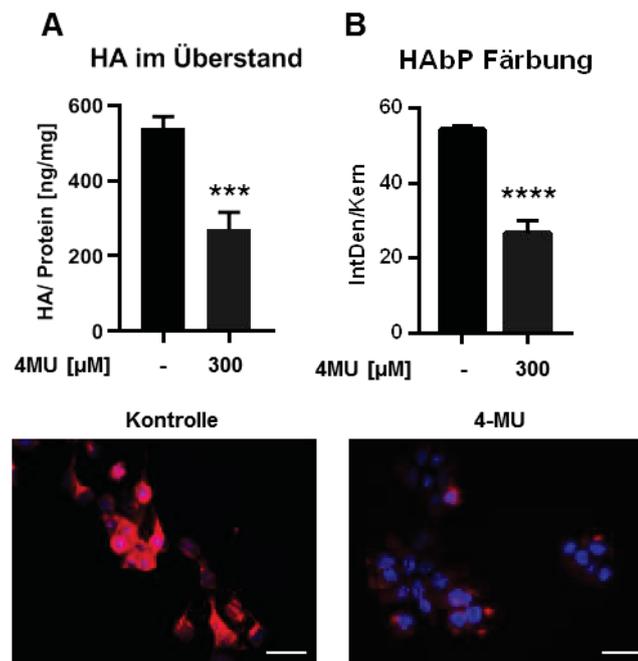


Abbildung 5: 4-MU inhibiert die HA-Synthese

A Die HA-Konzentration wurde im Überstand mittels ELISA-ähnlicher Immunaффinitätsmessung nach Behandlung mit 300 μ M 4-MU gemessen. (n=3) **B** Die HAbP-Färbung dient der Ermittlung der HA-Menge in der perizellulären Matrix (rot). Die Intensität wurde zur Zellzahl (blau, Hoechst) normalisiert (n=7, jedes n stellt eine gepoolte Analyse von 5 Replikaten dar). Es werden repräsentative Bilder gezeigt, Maßstabsbalken: 100 μ m. Mittelwerte \pm SEM, one-way ANOVA, ***p<0,005, ****p<0,001.

3.2 DCA schaltet die Tumorzellen auf mitochondriale oxidative Phosphorylierung um

Um den zugrunde liegenden Mechanismus der erhöhten HA-Synthese unter DCA-Behandlung zu identifizieren, wurden zunächst die Auswirkungen von DCA auf die aerobe Glykolyse und die ATP-Produktion validiert.

3.2.1 DCA reduziert dosisabhängig die zelluläre Glykolyse-Aktivität

Mittels Seahorse XFe96 wurde eine Echtzeit-Metabolismus-Analyse durchgeführt (2.4.4). Eine einheitliche Zellzahl von ESCCs wurde in die Lochplatte ausgesät und die basale Glykolyse-Aktivität ermittelt (Abbildung 6). Anschließend wurde DCA in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 20 oder 40 mM) injiziert und für 25 min inkubiert. Die anschließende Messung der Glykolyse-Aktivität wies eine signifikante und dosisabhängige Reduktion auf.

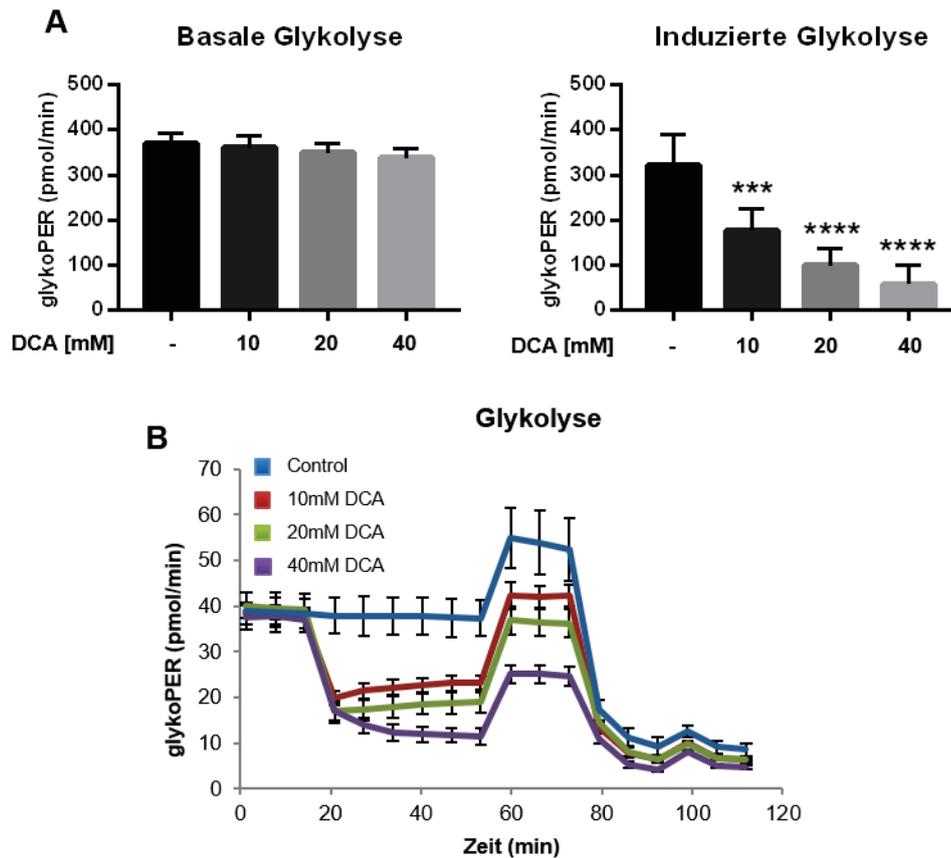


Abbildung 6: Die Glykolyse in ESCC wird durch DCA gehemmt.

Die Echtzeit-Stoffwechsel-Analyse durch das Seahorse XFe96 mit dem Glykolyse Rate Assay Kit wurde verwendet, um die akute Reaktion von KYSE-410-Zellen auf eine DCA-Stimulation zu messen. Der Wert glykoPER gibt an, wie viele Protonen in das umliegende Medium ausgestoßen werden und ist damit ein Maß für die Glykolyse-Aktivität der Zellen. **A** Die basale Glykolyse-Aktivität wurde in den ersten 15 min vermessen und danach die jeweilige DCA-Konzentration (10, 20 oder 40 mM) injiziert. Die dadurch veränderte Glykolyse wurde dann nach weiteren 25 min vermessen. **B** Der Graph zeigt einen repräsentativen Zeitverlauf der Seahorse XFe96-Analyse. Mittelwerte \pm SEM, n=6, one-way ANOVA, ***p<0,005, ****p<0,001 [154].

3.2.2 Die DCA-Behandlung von ESCCs erhöht die mitochondriale Respiration

Nachdem bei der Messung der Glykolyse-Aktivität ein deutlicher Rückgang verzeichnet wurde, wurde eine Analyse der mitochondrialen Respiration durchgeführt. Dabei war ein rapider und signifikanter Anstieg der mitochondrialen ATP-Produktion (Abbildung 7) zu beobachten, wobei bei der basalen Messung kein Unterschied zu verzeichnen war.

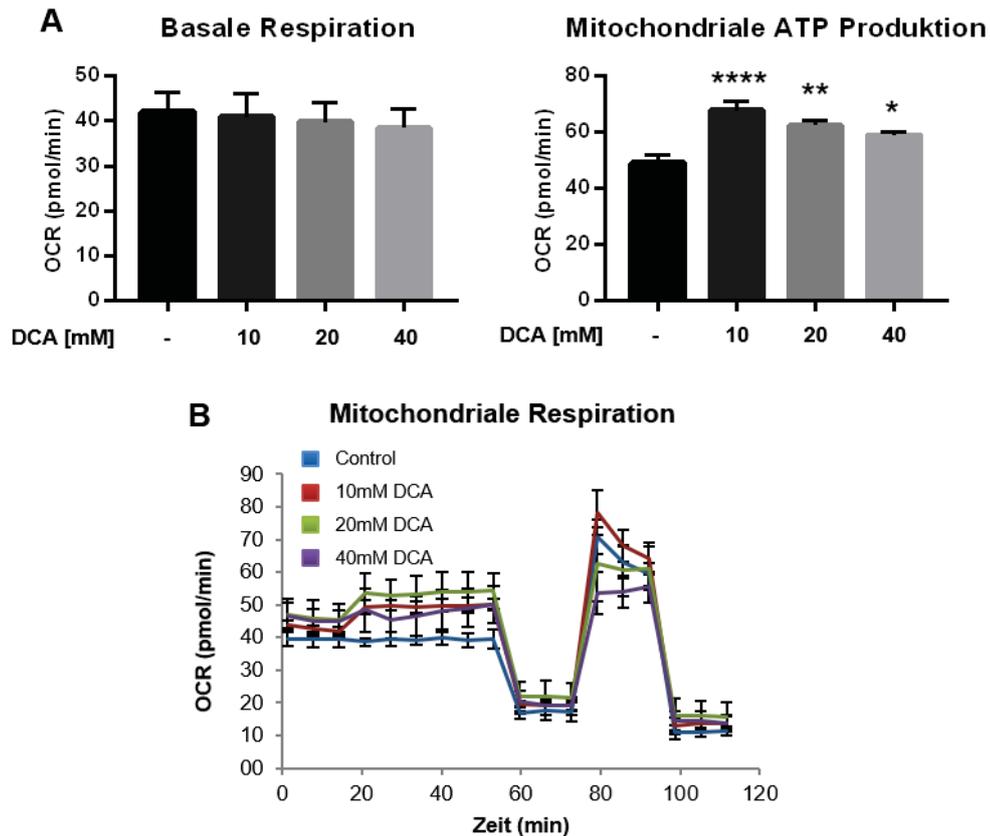


Abbildung 7: Die mitochondriale Respiration in ESCC wird durch eine DCA-Behandlung verstärkt

Die Echtzeit-Stoffwechselanalyse durch das Seahorse XFe96 mit dem Mito Stress Test Kit wurde verwendet, um die akute mitochondriale Reaktion von KYSE-410-Zellen auf eine DCA-Stimulation zu messen. Die OCR (Sauerstoffverbrauchsrate) definiert die Menge des verbrauchten Sauerstoffs während der mitochondrialen Atmung. **A** Die basale Respiration wurde in den ersten 15 min vermessen und danach die jeweilige DCA-Konzentration (10, 20 oder 40 mM) injiziert. Die dadurch induzierte mitochondriale ATP-Produktion wurde dann nach weiteren 25 min gemessen. **B** Der Graph zeigt einen repräsentativen Zeitverlauf der Seahorse XFe96-Analyse. Mittelwerte \pm SEM, n=6, one-way ANOVA, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,001 [154].

3.2.3 Die zelluläre Metaboliten-Konzentrationen verschieben sich unter DCA-Behandlung in Richtung der mitochondrialen Respiration

Um die Seahorse-Daten zu verifizieren, wurde eine zusätzliche HPLC-Analyse der intra- und extrazellulären Metaboliten durchgeführt. Dabei fokussierte sich die Auswertung auf die zentralen Moleküle der Glykolyse (Pyruvat und Laktat) und des mitochondrialen Zitratzykluses (Malat). Pyruvat ist der zentrale Metabolit zwischen Glykolyse und mitochondrialer Respiration, da es einerseits zu Laktat oder auch zu Acetyl-CoA umgesetzt werden kann. Durch eine DCA-Behandlung war keine

signifikante Veränderung in der Pyruvatkonzentration zu verzeichnen (Abbildung 8A). Malat als Maß der mitochondrialen Respiration akkumulierte in Anhängigkeit der DCA-Konzentration und zeigte einen sechsfachen Anstieg nach Stimulation mit 40 mM DCA im Vergleich zur Kontrolle. Laktat wurde intra- und extrazellulär quantifiziert, da es nach der Umsetzung von Pyruvat zu Laktat zu einem rapiden Export durch den Transporter MCT kommt und dadurch die intrazelluläre Fraktion nicht repräsentativ ist. Dementsprechend konnte kein Unterschied im intrazellulären Laktat festgestellt werden (Abbildung 8A). Auf der anderen Seite kam es zu einer signifikanten Reduktion in der extrazellulären Fraktion (Abbildung 8B).

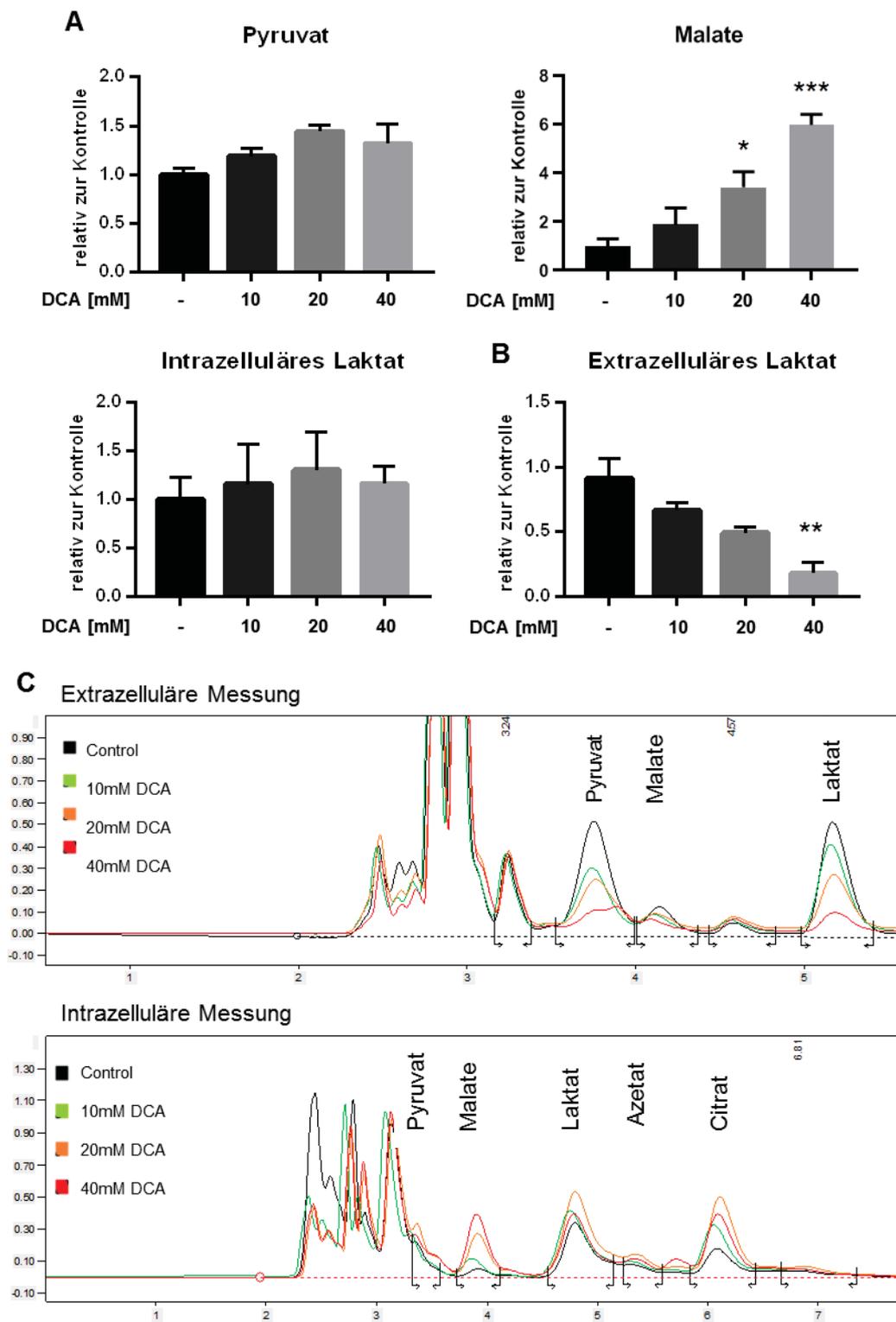


Abbildung 8: DCA induziert einen Anstieg in Malat und eine Reduktion in Laktat

Die zentralen Metaboliten der Glykolyse und des Zitratzyklus wurden mittels HPLC analysiert. KYSE-410-Zellen wurden mit DCA (10, 20 oder 40 mM) für 72 Std inkubiert und anschließend untersucht. Dafür wurden 7×10^5 ESCC lysiert und anschließend deproteinisiert. **A** Die Area under the curve (AUC) von Pyruvat, als zentraler Schnittpunkt zwischen Glykolyse und mitochondrialer Respiration, Malat, als Maß des mitochondrialen Zitratzyklus und Laktat, als

Endpunkt der Glykolyse, wurden gemessen. **B** Das intrazelluläre Laktat wird rapide in den extrazellulären Raum exportiert. Deswegen wurde auch die Laktatkonzentration im Überstand der Zellen gemessen. **C** Die Graphen zeigen repräsentative Chromatogramme einer Überlagerung der Einzelmessungen eines Probensets der extrazellulären- und intrazellulären-Messung. Mittelwerte \pm SEM, $n=5$, one-way ANOVA, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,005$ [154].

3.2.3.1 Validierung der Linearität der Metaboliten-Messung mittels HPLC

Um die Metaboliten in ihrer physiologischen Konzentration messen zu können, musste zunächst ein Linearitätsnachweis der Detektionsmethode der Standardsubstanzen durchgeführt werden. Die physiologische Konzentration von Pyruvat liegt um $100 \mu\text{M}$ [156]. Daher wurde die Standardkonzentration zwischen 10 und $500 \mu\text{M}$ gewählt, für die eine gute Nachweisbarkeit in diesem Bereich nachgewiesen wurde (Abbildung 9A). Unter basalen Bedingungen liegt Malat intrazellulär zwischen $500 \mu\text{M}$ und 2 mM vor [157]. Der Bereich von $250 \mu\text{M}$ bis 2 mM erreichte eine Linearität in diesem Messbereich (Abbildung 9B). Extrazelluläre physiologische Laktatkonzentrationen von 2 mM bis 40 mM wurden im Tumorgewebe gefunden [156, 158]. Konzentration im Bereich zwischen $500 \mu\text{M}$ bis 8 mM zeigten eine lineare Nachweisbarkeit (Abbildung 9C). Alle physiologischen Metaboliten-Konzentrationen lagen im Bereich der Linearität und konnten somit erfolgreich mittels HPLC nachgewiesen werden.

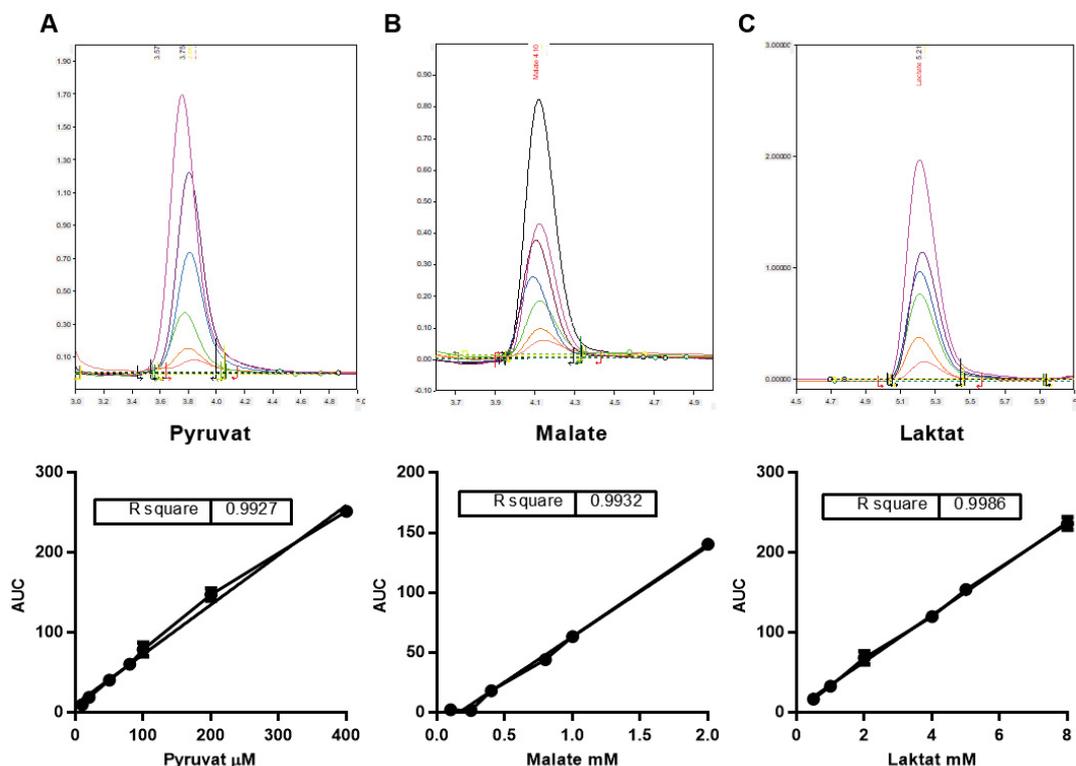


Abbildung 9: Standardkurven der nachgewiesenen Metaboliten mittels HPLC

Die lineare Nachweisbarkeit jedes Metaboliten wurde mithilfe einer Standardkurve ermittelt. **A** Pyruvat wurde zwischen 10 μM und 400 μM vermessen. **B** Malat bewies eine gute Linearität zwischen 250 μM und 2 mM. **C** Für den Metaboliten Laktat wurden die Standardkonzentrationen 500 μM bis 8 mM gewählt. Mittelwerte \pm SD, n=3

3.2.3.2 Validierung der Signalidentifikation und des Hintergrundsignals

Für eine erfolgreiche Analyse der Metaboliten mithilfe der HPLC sind genaue Identifikationen der einzelnen Signale notwendig. Deswegen wurden Standardsubstanzen in Einzel- und Mischinjektionen detektiert bis jeder der zu messenden Metaboliten einem Signal zu zuordnen war (Abbildung 10A). Zusätzlich ist die Eliminierung störender Hintergrundsignale aus dem Lösungsmittel der Proben erforderlich. Der verwendete HPLC-Lysepuffer wies kein Signal im Bereich der Metaboliten auf und konnte daher zur Analyse verwendet werden (Abbildung 10B).

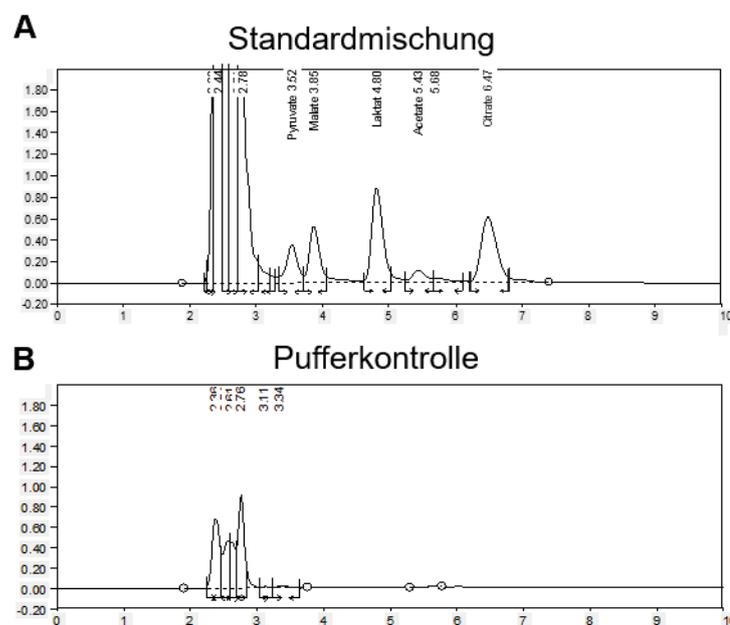


Abbildung 10: Metaboliten-Identifikation und Pufferhintergrundsignal-Messung

A Eine exemplarische HPLC-Messung einer Standardmischung der Metaboliten (von links nach rechts, in Klammern die jeweilige Retentionszeiten): 100 μM Pyruvat (3,5 min), 500 μM Malat (3,9 min), 2 mM Laktat (4,8 min), 1 mM Acetat (5,4 min) und 200 μM Citrat (6,5 min). **B** Hintergrundmessung des HPLC-Lysepuffers über die Retentionszeit der Metaboliten. n=5.

3.3 DCA erhöht das Reservoir der HA-Vorläufer und die O-GlcNAcylierung von Proteinen

Um den Mechanismus hinter der steigenden HA-Konzentration durch Behandlung mit DCA zu ergründen, wurden der frühe Glukosemetabolit G-6-P, die zwei HA-Vorläufer UDP-Glukuronsäure und UDP-N-Acetylglukosamin und die O-GlcNAcylierung von Proteinen analysiert.

3.3.1 Die Glukose-6-Phosphat-Konzentration wird durch eine DCA-Behandlung erhöht

G-6-P ist ein zentraler Metabolit der Umsetzung von Glukose zu Pyruvat, zusätzlich dient er auch als Substrat für den HA-Vorläufer UDP-Glukuronsäure. Als Reaktion auf die DCA-Behandlung stieg das frühe Glukosestoffwechselprodukt G-6-P dosisabhängig an (Abbildung 11).

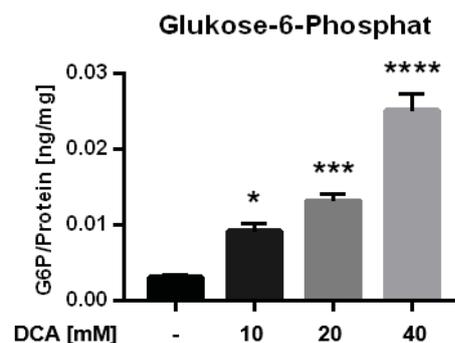


Abbildung 11: Die Glukose-6-Phosphat Konzentration steigt dosisabhängig durch die DCA-Behandlung

Die G-6-P-Konzentration wurde mit einem kolorimetrischen Testverfahren gemessen. Dafür wurden KYSE-410-Zellen für 72 Std mit unterschiedlichen DCA Konzentrationen (10, 20 oder 40 mM) inkubiert. Die Zellen wurden dann lysiert und die intrazelluläre Fraktion auf ihren G-6-P-Gehalt nach Herstellerangaben vermessen. Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, one-way ANOVA, * $p<0,05$, *** $p<0,005$, **** $p<0,001$ [154].

3.3.2 Der HA-Vorläufer-Pool akkumuliert durch DCA-Behandlung

Die UDP-Zucker können durch eine FACE-Analyse identifiziert und quantifiziert werden. HA wird aus den zwei UDP-Zuckern UDP-GlcUA und UDP-N-Acetylglukosamin gebildet. Der Metabolit UDP-GlcUA konnte nicht durch die Analyse gemessen werden, jedoch zeigte der vorgeschaltete UDP-Zucker UDP-Glukose eine gute Mess-Sensitivität. Da UDP-Glukose ausschließlich zu UDP-GlcUA umgewandelt wird, kann eine Quantifizierung von UDP-Glukose einen Rückschluss auf diesen direkten HA-Vorläufer geben. Die FACE-Analyse bewies jedoch, dass UDP-Glukose

durch eine DCA-Stimulation nicht zunimmt (Abbildung 12A). Dieser Befund kann auf eine schnelle Verstoffwechslung und Verwendung dieses Vorläufers in der HA-Synthese hinweisen. 4-MU inhibiert die HA-Synthese, indem sich 4-MU-GlcUA anstatt UDP-GlcUA bildet und damit die vorhandene Menge an UDP-GlcUA verringert. In der Folge können durch die HA-Synthasen weniger HA-Ketten gebildet werden. KYSE-410-Zellen, die mit 4-MU behandelt wurden, zeigten entsprechend eine vermehrte Akkumulation des Vorläufers UDP-Glukose (Abbildung 12A). 4-MU hat keinen Effekt auf den zweiten HA-Vorläufer UDP-N-Acetylglucosamin. Dies konnte auch mithilfe der FACE-Analyse demonstriert werden (Abbildung 12B). Eine Behandlung mit DCA hingegen zeigte einen dosisabhängigen Anstieg des Acetyl-Zuckers.

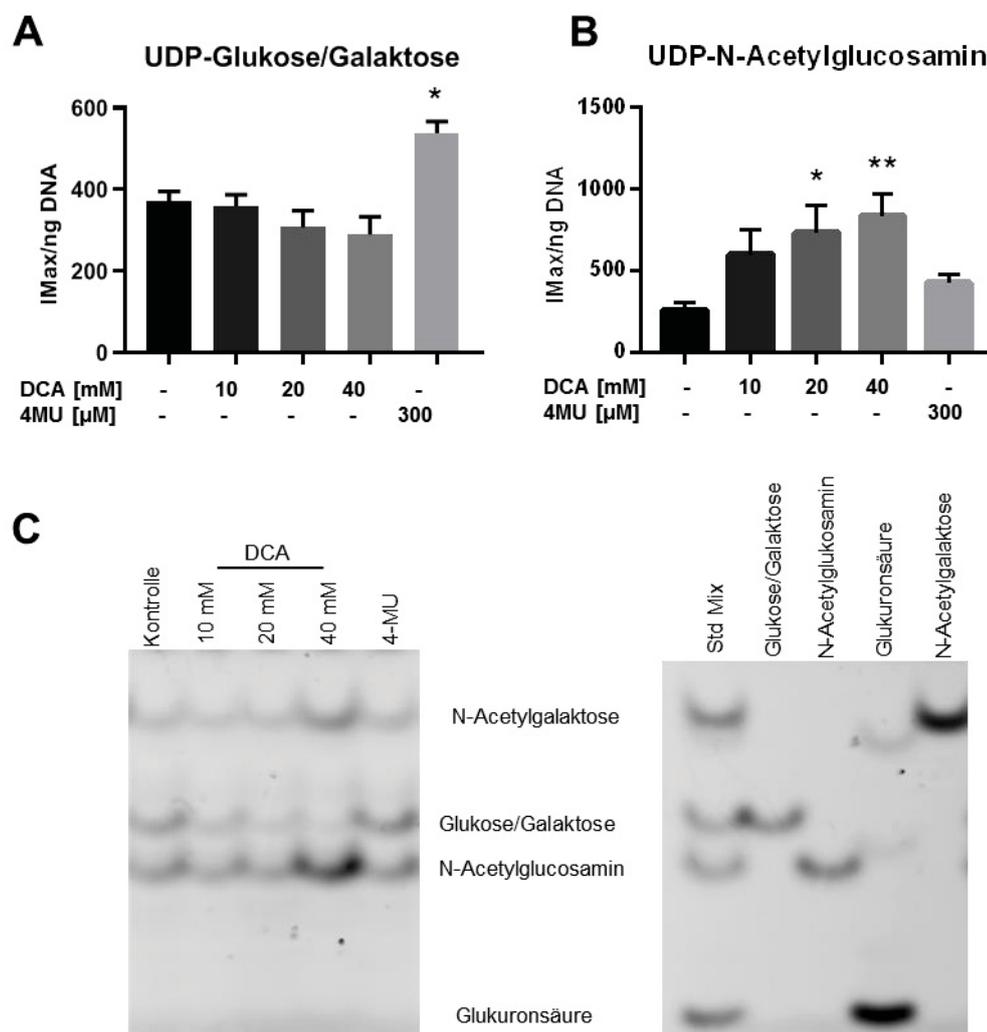


Abbildung 12: Der UDP-HA-Vorläufer UDP-N-Acetylglucosamin akkumuliert durch eine Behandlung mit DCA

Mithilfe von FACE können UDP-Zucker wie **A** UDP-Glukuronsäure und **B** UDP-N-Acetylglucosamin identifiziert und quantifiziert werden. KYSE-410-Zellen wurden mit DCA oder 4-MU für 72 Std behandelt. Die intrazellulären UDP-Zucker wurden dann isoliert, durch AMAC sichtbar gemacht und mittels Elektrophorese voneinander getrennt. Die Intensität des

spezifischen Zuckers wurde gemessen und zur DNA-Konzentration normalisiert. **C** Ein repräsentatives Elektrophoresegel mit Proben (links) und einer Standardmischung und Einzelstandardsubstanzen (rechts). Mittelwerte \pm SEM, $n=3-6$, one-way ANOVA, $*p<0,05$, $**p<0,01$ [154].

3.3.2.1 Acetyl-CoA ist das Verbindungsglied zwischen mitochondrialer Respiration und HA-Vorläuferpool

Zytosolisches Acetyl-CoA entsteht, wenn Citrat durch die Enzyme *Citrat-Carrier* (CiC) und ATP-Citrat-Lyase (CL) aus den Mitochondrien ins Zytosol transportiert und umgewandelt wird. Dort fungiert es als Kofaktor für die Umwandlung von Glucosamin-6-Phosphat zu N-Acetyl-Glucosamin-6-Phosphat, das anschließend zu N-Acetylglucosamin umgesetzt wird [159]. Die zytosolische Acetyl-CoA-Konzentration stieg dosisabhängig nach der DCA-Behandlung an (Abbildung 13A). Um zu untersuchen, ob das Acetyl-CoA mitochondrialen Ursprungs ist, wurden der Export und die Umsetzung von Citrat zu Acetyl-CoA durch den Inhibitor SB204990 gehemmt. Der Inhibitor konnte die geringe Acetyl-CoA-Konzentration der Kontrollen nicht weiter verringern, jedoch konnte er den stimulierenden Effekt von 40 mM DCA komplett aufheben und auf das Niveau der Kontrollzellen absenken (Abbildung 13B).

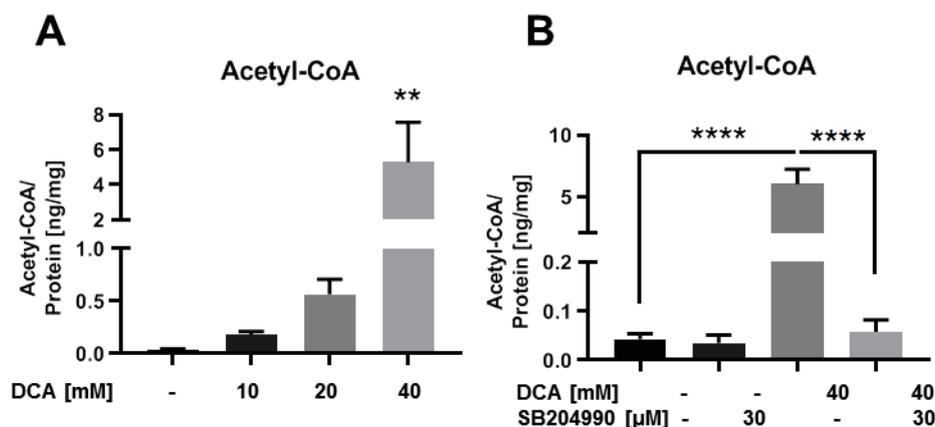


Abbildung 13: Die DCA-Behandlung führt zu einer Erhöhung der Acetyl-CoA-Konzentration

Zytosolisches Acetyl-CoA ist ein Kofaktor bei der Synthese von N-Acetylglucosamin-Vorläufer-Molekülen. Acetyl-CoA kann durch eine kolorimetrische Messung quantifiziert werden. **A** KYSE-410-Zellen wurden für 72 Std mit DCA (10, 20 oder 40 mM) inkubiert und die zytosolische Fraktion analysiert. **B** Der zytosolischer Export und die Umsetzung von Zitrat zu Acetyl-CoA kann durch den Inhibitor SB204990 blockiert werden. Daher wurden zur mechanistischen Spezifizierung die ESCC-Zellen mit DCA (40 mM) und/oder SB204990 (30 µM) behandelt und gemessen. Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, one-way ANOVA, $**p<0,01$, $****p<0,001$ [154].

3.3.2.2 Eine Verringerung der zytosolischen Acetyl-CoA-Konzentration reduziert die HA-Synthese

Um die direkte Verbindung zwischen Acetyl-CoA und HA-Synthese zu beweisen, wurden KYSE-410-Zellen mit DCA und/oder dem CL-Inhibitor SB204990 behandelt und die HA-Konzentration im Überstand gemessen. Auch hier konnte der Inhibitor allein die HA-Konzentration nicht verringern. Wurden die Zellen mit 40 mM DCA behandelt, stieg der HA-Gehalt auf ein Vielfaches an. Eine gleichzeitige Stimulation mit DCA und SB204990 hob diesen Anstieg komplett auf (Abbildung 14).

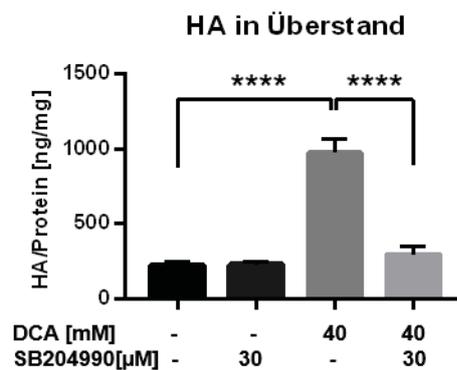


Abbildung 14: Der induzierte Effekt durch DCA auf die HA-Synthese kann durch den Acetyl-CoA-Inhibitor SB204990 aufgehoben werden

Die KYSE-410-Zellen wurden mit DCA (40 mM) und/oder SB204990 (30 µM) für 3 Tage behandelt und die HA-Konzentration im Überstand mittels ELISA-ähnlicher Analyse gemessen. Mittelwerte \pm SEM, n=6, one-way ANOVA, ****p<0,001 [154].

3.3.3 DCA induziert die vermehrte O-GlcNAcysierung von Proteinen

In vorherigen Publikationen wurde demonstriert, dass eine erhöhte O-GlcNAcysierung direkt die Aktivität der HAS-Enzyme steigert [138, 160]. Im Einklang mit dem beobachteten Anstieg des UDP-GlcNAc-Pools führte die DCA-Behandlung zu einer starken Induktion der O-GlcNAcysierung von zellulären Proteinen. Diese konnten mittels Immunohistochemie (Abbildung 15) und Immunoblot (Abbildung 16) nachgewiesen werden. Der GlcNAc-Transferase (OGT)-Inhibitor, Alloxan, hob den induzierenden Effekt der DCA auf und senkte die Menge der O-GlcNAcysierten Proteine unter die Basalkonzentration der KYSE-410-Zellen.

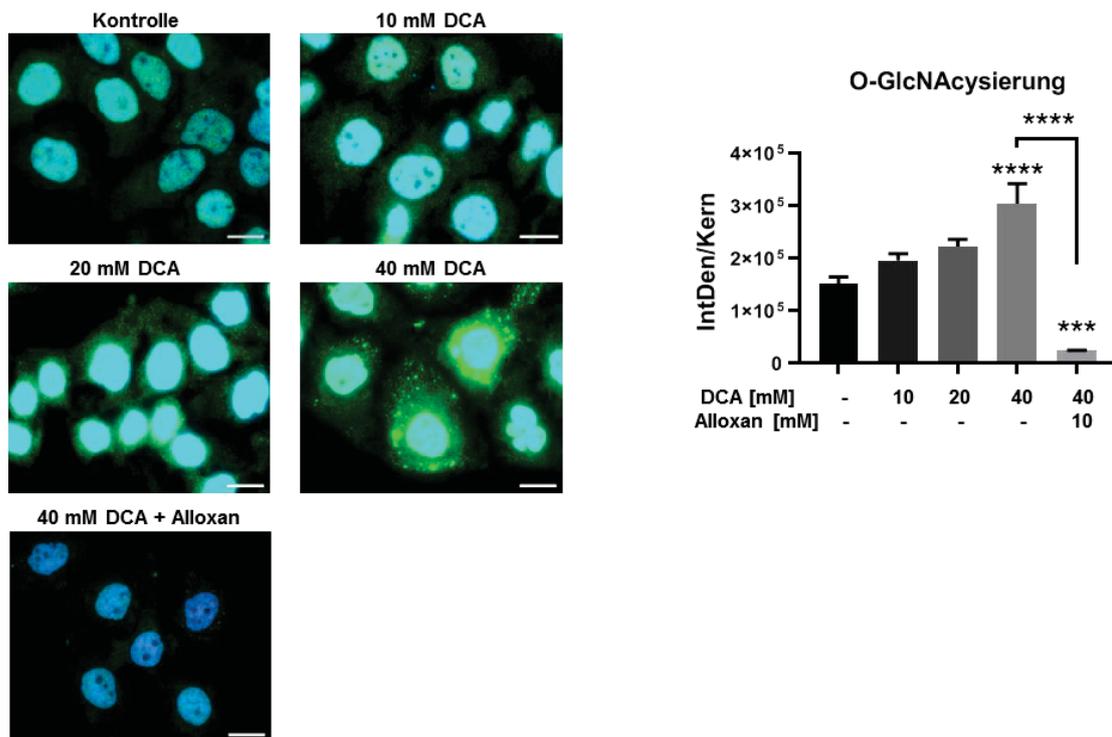


Abbildung 15: DCA verstärkt die O-GlcNAcysierung von intrazellulären Proteinen

Repräsentative Bilder von KYSE-410-Zellen wurden mit DCA (10, 20 oder 40 mM) und/oder der Negativkontrolle, dem O-GlcNAc Transferase (OGT)-Inhibitor Alloxan (10 mM), für 72 Std behandelt. Die Zellen wurden dafür auf Glasplättchen ausgesät und mithilfe des O-GlcNAc-Antikörpers (grün) angefärbt. Die Intensität wurde zur Zellzahl (blau, Hoechst) normalisiert ($n=8$, jedes n stellt eine gepoolte Analyse von 5 Replikaten dar). Maßstabsbalken: 100 μm . Mittelwerte \pm SEM, one-way ANOVA, *** $p<0,005$, **** $p<0,001$ [154].

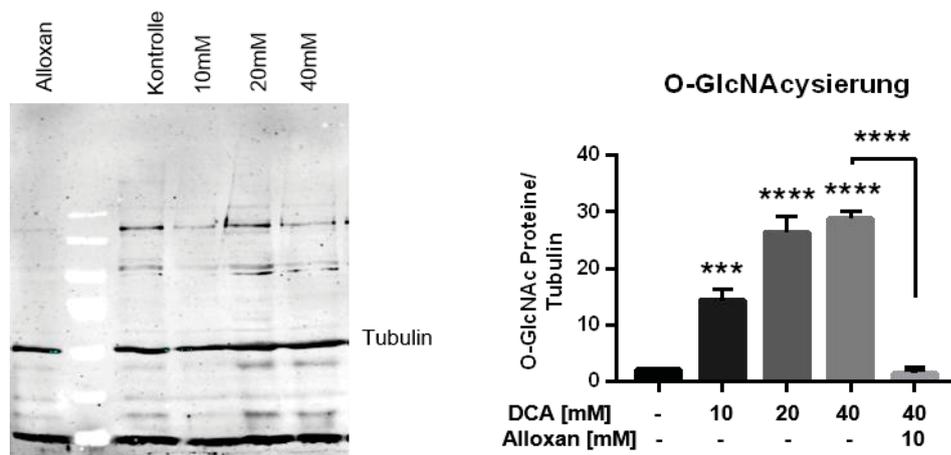


Abbildung 16: DCA induziert die Akkumulation der O-GlcNAcysierung von Proteinen

Mittels Western-Blot-Analyse und dem O-GlcNAc-Antikörper konnte die Gesamtheit aller O-GlcNAcysierten Proteine gemessen werden. Die Intensität aller Banden wurde analysiert und zur Intensität des Proteins Tubulin normalisiert. Für die Bestimmung wurden KYSE-410-Zellen

mit DCA (10, 20 oder 40 mM) und/oder Alloxan (10 mM) für 72 Std behandelt. Mittelwerte \pm SEM, n=6, one-way ANOVA, ***p<0,005, ****p<0,001 [154].

3.4 DCA in Kombination mit 4-MU führt zu reduziertem Zellwachstum und gesteigerter Apoptose-Induktion

DCA ist eine metabolische Intervention für glykolytische Tumore. Durch Reaktivierung der mitochondrialen Respiration kommt es zum Zelltod [96, 125]. Die effektiven Dosen gingen aber mit einer erhöhten Nebenwirkungsrate in klinischen Studien einher [109, 110, 125]. Eine Kombinationstherapie, die darauf abzielt, die Effektivität einer Behandlung mit DCA zu steigern, könnte die benötigte Dosis von DCA absenken und auf diesem Wege die Nebenwirkungsrate verbessern. Wie die bisherigen Experimente ergaben, stimulierte die Behandlung mit DCA die HA-Synthese. Eine erhöhte HA-Produktion wurde in vielen Studien als tumorprotektiv beschrieben [161, 162]. Daher wurde im Weiteren eine Kombinationstherapie des metabolischen Inhibitors DCA und des HA-Synthase-Hemmers 4-MU untersucht.

3.4.1 DCA reduziert dosisabhängig das Zellwachstum von ESCC-Zellen

Um eine effiziente DCA-Konzentration zu identifizieren, die zu einer signifikanten Zellwachstumshemmung führt, wurden KYSE-410-Zellen mit unterschiedlichen Dosierungen inkubiert und die Zellzahl täglich über einen Zeitraum von 72 Std bestimmt (Abbildung 17A). Bereits mit 10 mM DCA konnte eine signifikante Zellreduktion gemessen werden. Dieser Effekt stieg dosisabhängig. Um die Effekte von DCA auf gesunde Stromazellen zu untersuchen, wurden ebenfalls Fibroblasten (NHDF-Zellen) mit DCA stimuliert und das Zellwachstum quantifiziert (Abbildung 17B). In den getesteten Konzentrationen konnte kein Effekt von DCA auf das Zellwachstum identifiziert werden.

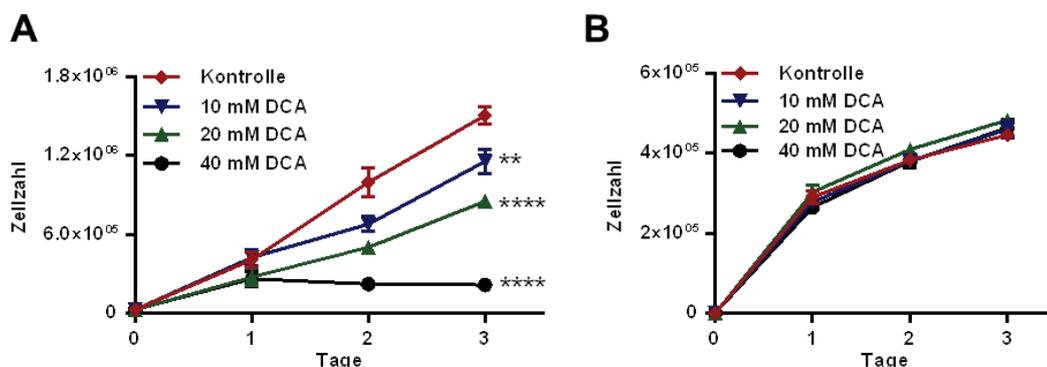


Abbildung 17: DCA verringert die Zellzahl der Krebszellen, zeigt jedoch keinen Effekt auf Fibroblasten

A KYSE-410-Zellen [154] oder **B** NHDF-Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen mit verschiedenen DCA-Konzentrationen (10, 20 oder 40 mM) behandelt und täglich mithilfe einer Neubauer-Zellkammer gemessen. Mittelwerte \pm SEM, $n=3,7$, one-way ANOVA, $**p<0,01$, $****p<0,001$.

3.4.1.1 Die Kombination von DCA und 4-MU bewirkt synergistisch eine Zellzahlreduktion

Wenn zwei Substanzen ihre Wirkung bei gemeinsamer Einnahme verstärken und dabei ihren additiven Effekt übertreffen, spricht man vom Synergismus [150]. Um einen möglichen synergistischen Effekt von DCA und 4-MU zu testen, wurde ein sogenannter Kombinationsindex (CI) nach Cho berechnet. Dabei wird der jeweilige inhibierende Effekt der Medikamente in Einzel- und Kombinationsdosen analysiert und der CI bestimmt. Der CI muss unter 0,9 liegen, um einen Synergismus zu beschreiben. Bei den gemessenen Kombinationen 10 mM DCA + 100 μ M 4-MU, 20 mM DCA + 300 μ M 4-MU und 40 mM DCA + 300 μ M 4-MU war dies der Fall. Da frühere Untersuchungen eine hohe Effektivität von 4-MU *in vitro* und *in vivo* mit 300 μ M dokumentierten, wurde für weitere Versuche diese Konzentration gewählt [124, 139]. Zusätzlich wurde die geringstmögliche Konzentration an DCA gewählt, die mit 300 μ M 4-MU einen synergistischen Effekt aufwies.

Tabelle 10: Berechnung des Synergismus

Dosis DCA [mM]	Dosis 4-MU [μ M]	Effekt*	CI
10	100	0,3917	0,70248
20	100	0,2949	0,93773
40	100	0,1382	1,05836
10	300	0,4178	1,03525
20	300	0,2027	0,65545
40	300	0,0575	0,5973

* Anteil der lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle; Mittelwerte \pm SEM, $n=3$ [154]

Die gewählten DCA- und 4-MU-Konzentrationen wurden in einem separaten Experiment über einen Zeitraum von 3 Tagen detaillierter untersucht. Dabei konnte bereits mit den einzelnen Substanzen eine signifikante Reduktion der Zellzahl demonstriert werden. In Kombination wurde eine signifikante Abnahme der Zellzahl sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch zur Einzelbehandlung beobachtet (Abbildung 18).

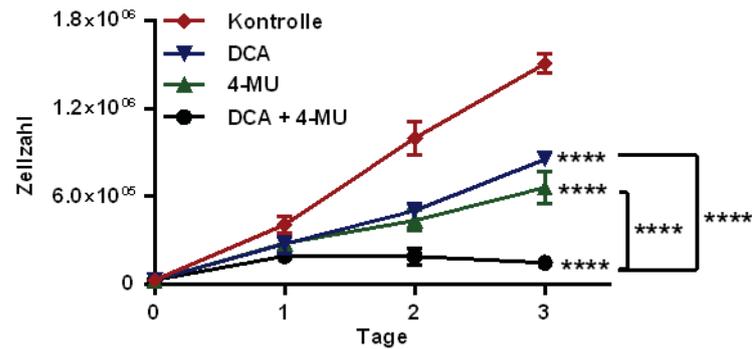


Abbildung 18: Die Kombinationstherapie von DCA und 4-MU reduziert die Zellzahl deutlicher als die Einzeltherapien

KYSE-410-Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen mit DCA (20 mM) und/oder 4-MU (300 μ M) inkubiert. Die Zellzahl wurde täglich mithilfe einer Neubauer-Zellkammer bestimmt und anschließend statistisch ausgewertet. Mittelwerte \pm SEM, n=7, one-way ANOVA, ****p<0,001 [154].

3.4.1.2 Ein siRNA-Silencing der HA-Rezeptoren und der HA-Synthase 3 reduziert die Zellzahl in Kombination mit DCA

Um die Bedeutung des HA-Systems im Kontext der synergistischen Wirksamkeit der Kombination von DCA und 4-MU detaillierter zu untersuchen, wurde die Quantifizierung der Zellzahlen unter DCA in Kombination mit einer genetischen Herabregulation von *HAS3*, *CD44* und *RHAMM* wiederholt (Abbildung 19A). Die Herabregulierung von *HAS3* ähnelte den Effekten von 4-MU und zeigte eine deutliche Beeinträchtigung des Tumorzellwachstums, die in Kombination mit DCA tendenziell noch stärker ausgeprägt war. Die Herabregulierung der HA-Rezeptoren hatte einen deutlich schwächeren Effekt auf das Zellwachstum, der jedoch durch die Zugabe von DCA verstärkt wurde. Die HA-Rezeptoren *RHAMM* und *CD44*, sowie die *HAS3*-Expression wurden durch siRNA unterschiedlich stark reguliert (Abbildung 19B). Die Herabregulation von *HAS3* führte zu keiner kompensatorische Gegenregulation von *HAS2*.

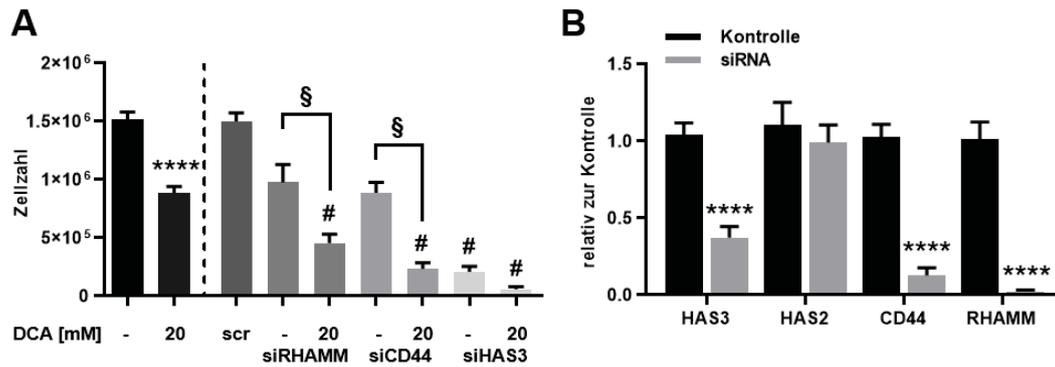


Abbildung 19: siRNA Inhibition von RHAMM, CD44 und HAS3 zusammen mit DCA reduziert die Zellzahl

In ESCC-Zellen wurde die Expression von *RHAMM*, *CD44* oder *HAS3* mittels siRNA herunterreguliert. **A** Die Zellen wurden mit oder ohne DCA (20 mM) weitere 3 Tage inkubiert und anschließend die Zellzahl gemessen. **B** Zur Effizienzkontrolle wurden nach 48 Std Proben entnommen und per qPCR analysiert. Dabei wurde die cDNA-Konzentration im Vergleich zu einer internen Kontrolle verglichen. Mittelwerte \pm SEM, $n=7$, one-way ANOVA, **** $p<0,001$, # $p<0,05$ im Vergleich zur *Scrambled-Kontrolle*, § $p<0,05$ im Vergleich zur reinen siRNA-Behandlung [154].

3.4.2 Die Kombinationstherapien von DCA und 4-MU aktivieren die Apoptose

Ob die beobachtete Zellreduktion auf einer induzierten Apoptose basiert, wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Hierbei wurde das PARP-Protein analysiert, dessen Spaltung ein typisches Merkmal der Apoptose ist. Ungeschnittenes PARP (tPARP) wird während der Apoptose durch freigesetzte Caspasen degradiert und als gespaltenes PARP (cPARP) detektiert. Der Grad der Apoptose kann dann als Verhältnis von cPARP zu tPARP gemessen werden. Bei den einzelnen Substanzen konnte keine signifikante Induktion der Apoptose verzeichnet werden, jedoch ergab die Kombination von beiden einen deutlichen Anstieg des cPARP Anteils. Staurosporin wurde hier als Positiv-Kontrolle verwendet. Die wichtigste biologische Aktivität von Staurosporin ist die Hemmung von Proteinkinasen durch die Verhinderung der ATP-Bindung an Kinasen. In der Forschung wird Staurosporin zur Induktion der Apoptose durch Aktivierung von Caspase-3 eingesetzt [163].

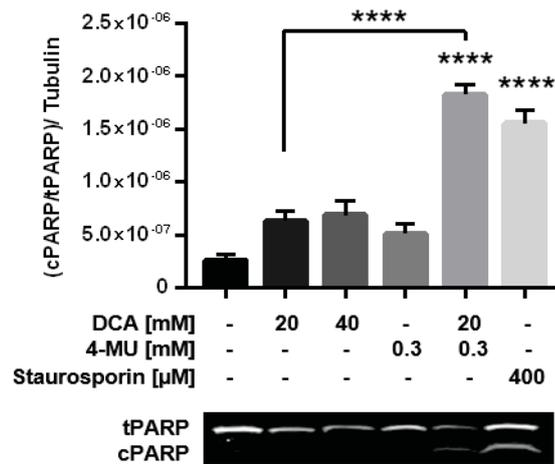


Abbildung 20: DCA und 4-MU induzieren in Kombination vermehrt die Apoptose

Mittels Western-Blot-Analyse wurde das Verhältnis zwischen der ungeschnittenen PARP (tPARP)-Konzentration und der geschnittenen PARP (cPARP)-Konzentration bestimmt. Der prozentuale Anteil des cPARP vom tPARP wurde über die gemessenen Intensitäten analysiert. Das Verhältnis wird zur Intensität des Proteins Tubulin normalisiert. Für die Bestimmung wurden KYSE-410-Zellen mit DCA (10, 20 oder 40 mM) und/oder 4-MU (300 μM) für 72 Std behandelt. Staurosporin (400 μM) wurde als Positiv-Kontrolle verwendet. Mittelwerte ± SEM, n=6, one-way ANOVA, ****p<0,001 [154].

3.5 Die Kombinationstherapie zeigt eine hohe Effektivität auf Tumor-Sphäroide

Es wurde berichtet, dass DCA *in vivo* und *in vitro* unterschiedliche Wirksamkeiten aufweist [164]. Diese Beobachtung kann damit zusammenhängen, dass der Tumorstoffwechsel durch die Sauerstoffverfügbarkeit, die sich mit dem Wachstum des Tumors verändert, signifikant moduliert wird. Darüber hinaus ändert sich auch die EZM als Reaktion auf die räumliche Interaktion der eingebetteten Zellen. Um diese Eigenschaften eines sich entwickelnden Tumors zu berücksichtigen, wurde ein 3D-Tumor-Sphäroidmodell entwickelt, um die Interaktion zwischen Stoffwechsel und EZM in diesem Umfeld zu untersuchen und die Wirkung von DCA und 4-MU während dieses Prozesses zu bestimmen.

3.5.1 Die 3D-Kultivierung führt zu einem Anstieg der Transkription von HAS3 und zentraler Proteine der aeroben Glykolyse

Realtime-PCR-Analysen demonstrierten, dass zwei der Hauptenzyme, die den Warburg-Effekt unterstützen, d.h. die PDK und die LDHA, eine starke Transkriptionsinduktion im Vergleich zur 2D-Kultur zeigten. Gleichzeitig war auch die mRNA-Expression der HA-Hauptsynthese (*HAS3*) in den untersuchten Zellen stark erhöht (Abbildung 21).

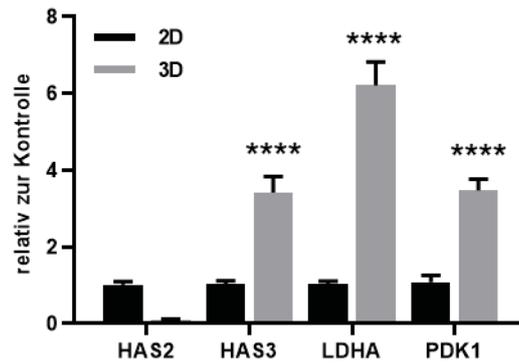


Abbildung 21: Ein qPCR-Expressionsvergleich 2D versus 3D

Vergleich der Genexpression der 2D- und 3D-Kulturen von HA-Synthasen und der aeroben Glykolyse. Dafür wurden für die 2D-Kulturen 5×10^5 KYSE-410-Zellen und für die 3D-Kulturen je 8 10-Tage-alte Sphäroide geerntet. Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, one-way ANOVA, **** $p < 0,001$ [154].

3.5.2 Die DCA-Behandlung von Tumor-Sphäroiden induziert die HA-Synthese

Zur Überprüfung, ob DCA auch im 3D-Modell zu einer Verstärkung der HA-Anreicherung in der EZM führt, wurden Paraffinschnitte von 10 Tage alten Tumor-Sphäroiden mittels HAbP gefärbt, um die HA-Konzentration zu analysieren. Die Inkubation mit DCA (20 mM) induzierte eine verstärkte HA-Synthese im Vergleich zur Kontrolle. Unter 4-MU-Behandlung konnte ein Trend zur Reduktion gemessen werden. Nur eine Kombinationsbehandlung führte zu einer signifikanten Verringerung der HA-Dichte im perizellulären Raum (Abbildung 22).

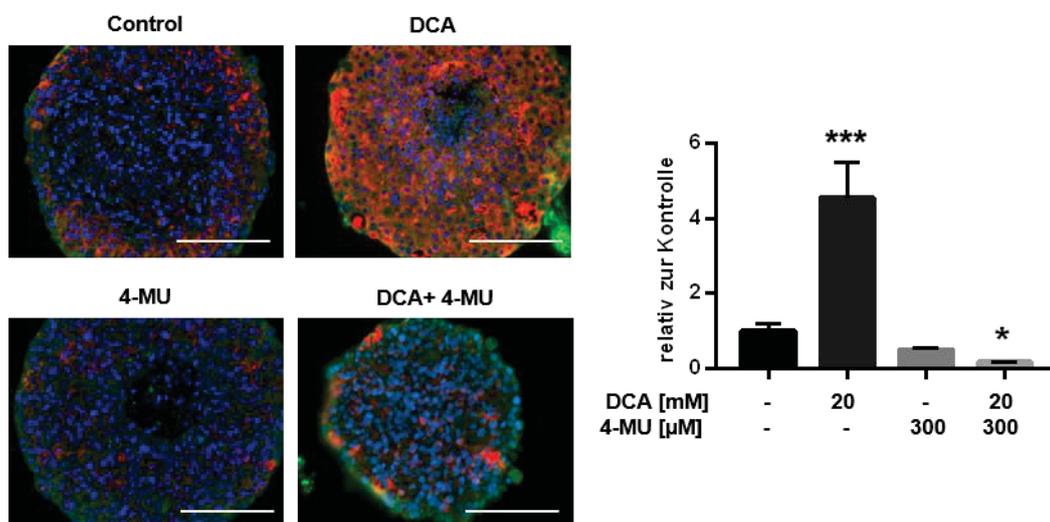


Abbildung 22: DCA stimuliert die HA-Synthese in 3D-Sphäroiden

Repräsentative Bilder von KYSE-410-Sphäroiden nach 10-tägiger Behandlung mit DCA und/oder 4-MU, die in Paraffin eingedeckt und von denen 5 µm dicke Schnitte angefertigt wurden. Die HA-Konzentration der Sektionen wurde dann mithilfe von HAbP (rot) und EpCAM (grün) analysiert. Die Kerne wurden durch Hoechst (blau) gefärbt und die Intensität von HAbP zur Anzahl der Kerne normalisiert. Maßstabsbalken: 200 µm. Mittelwerte ± SEM, n=3-7 (jedes n stellt eine gepoolte Analyse von 5 Replikaten dar), one-way ANOVA, *p<0,05, ****p<0,001.

3.5.3 Die Kombination von DCA und 4-MU führt zu einer Reduktion des Tumor-Sphäroidvolumens und zur Induktion der Apoptose

Angesichts der erhöhten Aktivität der Glykolyse und der HA-Synthese, die in diesem 3D-Ansatz beobachtet wurde, wurde im Folgenden untersucht, ob die Kombination von DCA und 4-MU die Apoptose auch unter 3D-Bedingungen effektiv induziert.

3.5.3.1 Das Sphäroidvolumen sinkt durch die Kombinationsbehandlung

Die 3D-Kulturen wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen mit DCA und/oder 4-MU behandelt und das Volumen der Sphäroide in regelmäßigen Abständen lichtmikroskopisch bestimmt. Bereits die Einzeltherapien inhibierten die Volumenzunahme in gleichem Maße. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in den 2D-Kulturen führte die Kombination von DCA und 4-MU nicht nur zu einer Wachstumshemmung wie bei den Monotherapien beobachtet, sondern auch zu einem deutlichen Rückgang des Sphäroidvolumens unter die Startgröße (Abbildung 23).

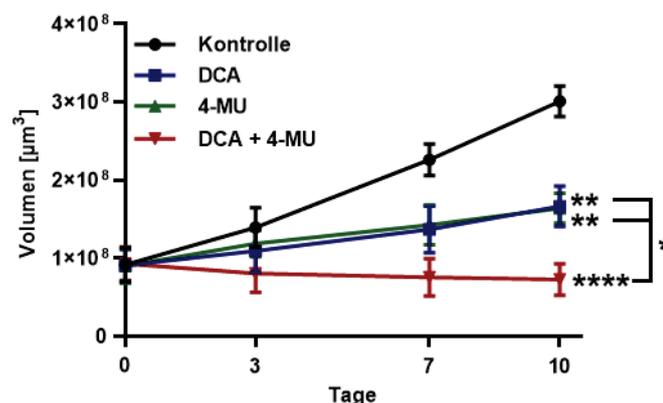


Abbildung 23: Volumenreduktion nach DCA und/oder 4-MU Behandlung von Sphäroiden

Es wurden Sphäroidvolumina von 24 Sphäroiden pro Kondition gemessen. 3D-Kulturen wurden für 4 Tage gezüchtet, um dann die Inkubation mit Medikamenten (20 mM DCA, 300 µM 4-MU oder die Kombination aus beiden) zu starten. Das Volumen wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen gemessen und lichtmikroskopisch überwacht. Das Volumen einer Kugel wurde basierend auf dem Durchmesser mit der Formel $V=1/6*\pi*d^3$ berechnet. Mittelwerte ± SEM, n=6

(ein n beinhaltete 24 Sphäroide pro Kondition), one-way ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$ [154].

3.5.3.2 Die kombinierte Inkubation mit DCA und 4-MU erhöht Zelltod und Apoptose der Tumorsphäroide

Am 10. Tag der Inkubation der ESCC-Sphäroide mit DCA und/oder 4-MU wurden die 3D-Kulturen hinsichtlich Indikatoren des Zelltodes oder der Apoptose gefärbt. Die Lebend-Tod-Färbung nativer Sphäroide mittels Ethidium Homodimer am 10. Tag präsentierte eine geringe Anzahl an toten Zellen in der Monotherapie mit 4-MU (300 μM). Im Gegensatz dazu verursachte die Monotherapie mit DCA (20 mM) die Freisetzung von toten Zellen aus dem Sphäroid. Allerdings reduzierte nur die Kombination beider Verbindungen die Größe der Sphäroide signifikant und verursachte eine Akkumulation toter Zellen in und um das Sphäroid (Abbildung 24A). Dieser Befund wurde durch eine Caspase 3 (Cas3)-Färbung bestätigt. Es präsentierten sich ein apoptotischer Kern unter der 4-MU-Behandlung und homogen verteilte apoptotische Zellen mit der DCA-Behandlung. Eine weit verbreitete Induktion der Apoptose wiesen die Sphäroide unter der Kombinationstherapie auf (Abbildung 24B).

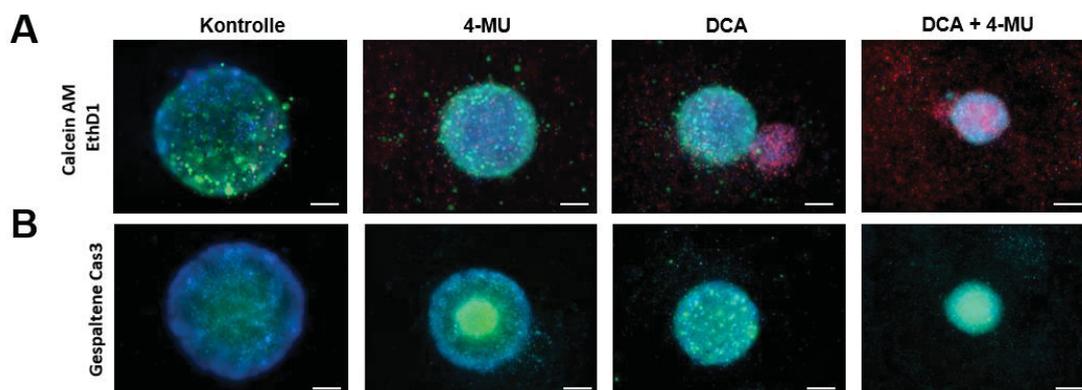


Abbildung 24: Die Kombinationsbehandlung von Sphäroiden mit DCA und/oder 4-MU induziert Zelltod und Apoptose

Repräsentative Bilder von 10 Tage alten Sphäroiden, die mit **A** Calcein AM, als Marker für proliferierende Zellen (grün), und EthD, als Kennzeichen für tote Zellen (rot), oder auf **C** gespaltene Caspase 3 (orange) gefärbt wurden. Die Kerne wurden mit Hoechst (blau) gegengefärbt. Maßstabsbalken: 200 μm , $n=6$ (ein n beinhaltete 8 Sphäroide pro Kondition) [154].

Die Aktivität der intrazellulären Phosphatasen steht im direkten Zusammenhang mit der Lebensfähigkeit der Zellen. Die Funktionalität der Phosphatasen kann mithilfe des APH-Assays gemessen werden. Die Zellvitalität von 10 Tage alten Sphäroiden sank

durch die Behandlung von DCA oder 4-MU, jedoch konnte nur eine Kombinations-Behandlung beider Substanzen eine signifikante Reduktion hervorbringen (Abbildung 25).

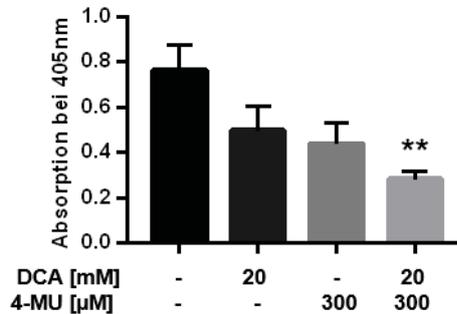


Abbildung 25: DCA und 4-MU in Kombination reduzieren die Zellvitalität

Durch die hydrolytische Umsetzung von p-Nitrophenyl-Phosphat zu p-Nitrophenol durch intrazelluläre Phosphatase kann auf die Zellvitalität zurückgeschlossen werden. Nachdem KYSE-410-Sphäroide für 10 Tage mit DCA und/oder 4-MU inkubiert wurden, wurde der APH-Assay durchgeführt. Mittelwerte \pm SEM, n=6 (ein n beinhaltet 16 Sphäroide pro Kondition), one-way ANOVA, $**p < 0,01$ [154].

3.5.4 Der Effekt von 4-MU auf Tumor-Sphäroiden kann durch siRNA-Inhibition reproduziert werden

Um den wachstumsretardierenden Effekt von 4-MU in den 3D-Kulturen auf die Inhibition der HA-Synthese zurückzuführen, wurden die vorangegangenen Experimente durch einen siRNA-Versuch verifiziert. Dabei wurden die HA-Rezeptoren RHAMM und CD44 sowie die primäre HA-Synthase 3 herunterreguliert und anschließend aus den modifizierten Zellen ein Tumor-Sphäroid geformt. Zusätzlich wurden die Sphäroide mit DCA (20 mM) behandelt.

3.5.4.1 Eine Inhibition von zentralen Proteinen des HA-Signalweges verstärkt die Volumenreduktion unter DCA

Nach 10-tägiger DCA-Behandlung wurde das Volumen der siRNA-Sphäroide gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass die Herabregulierung aller HA-Signalweg-Proteine eine signifikante Reduktion des Volumens im Vergleich zur *Scrambled*-Kontrolle verursachte (Abbildung 26B). Eine zusätzliche Inkubation mit DCA zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zur Einzelbehandlung mit siRNA (Abbildung 26A).

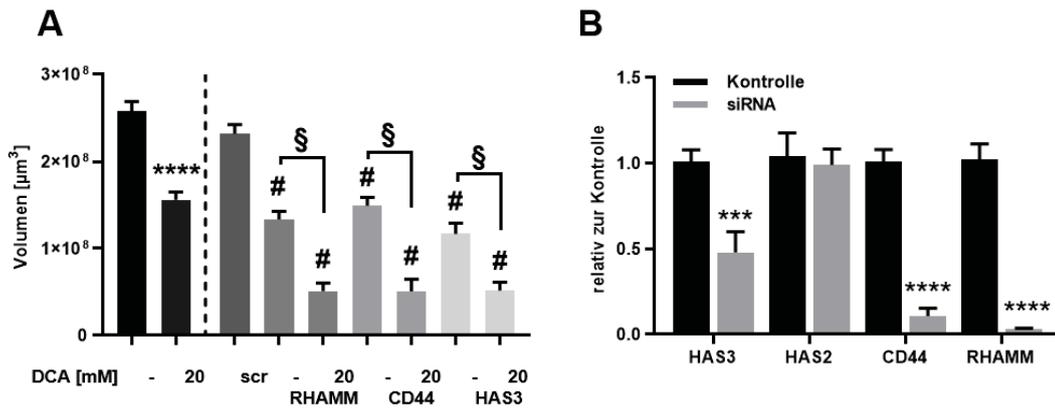


Abbildung 26: Das siRNA-Sphäroid-Volumen ist verringert in Kombination mit DCA

KYSE-410-Zellen wurden mit siRNA gegen RHAMM, CD44 und HAS3 inkubiert und nach 3 Tagen Tumor-Sphäroide geformt. Nach einer 4-tägigen Etablierungsphase wurden die 3D-Kulturen \pm 20 mM DCA für 10 Tage behandelt und das Tumolvolumen gemessen. **A** An Tag 10 wurde das Tumolvolumen statistisch ausgewertet. **B** Das inhibitorische Potenzial der siRNA wurde durch eine qPCR-Analyse überprüft. Mittelwerte \pm SEM, $n=6$ (ein n beinhaltet 24 Sphäroide pro Kondition), one-way ANOVA, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$; # $p < 0,05$ im Vergleich zur *Scrambled-Kontrolle*, § $p < 0,05$ im Vergleich zur reinen siRNA-Behandlung [154].

3.5.4.2 DCA-behandelte siRNA-Sphäroide zeigen vermehrten Zelltod und Apoptose

Die Lebend-Tod-Färbung nach 10-tägiger DCA-Therapie von siRNA-Sphäroiden dokumentierte eine Zunahme von toten Zellen in und um die 3D-Kulturen (Abbildung 27A). Dies konnte nicht in den Kulturen beobachtet werden, die ohne DCA kultiviert wurden. Deutlichere Unterschiede konnten in der Cas3-Färbung beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrolle wiesen Sphäroide, die mit siRNA gegen HAS3 und CD44 behandelt wurden, einen deutlichen Anstieg der apoptotischen Fraktion (Abbildung 27B) auf. Eine zusätzliche Inkubation mit DCA führte zu einer Steigerung der Apoptosefärbung aller 3D-Kulturen.

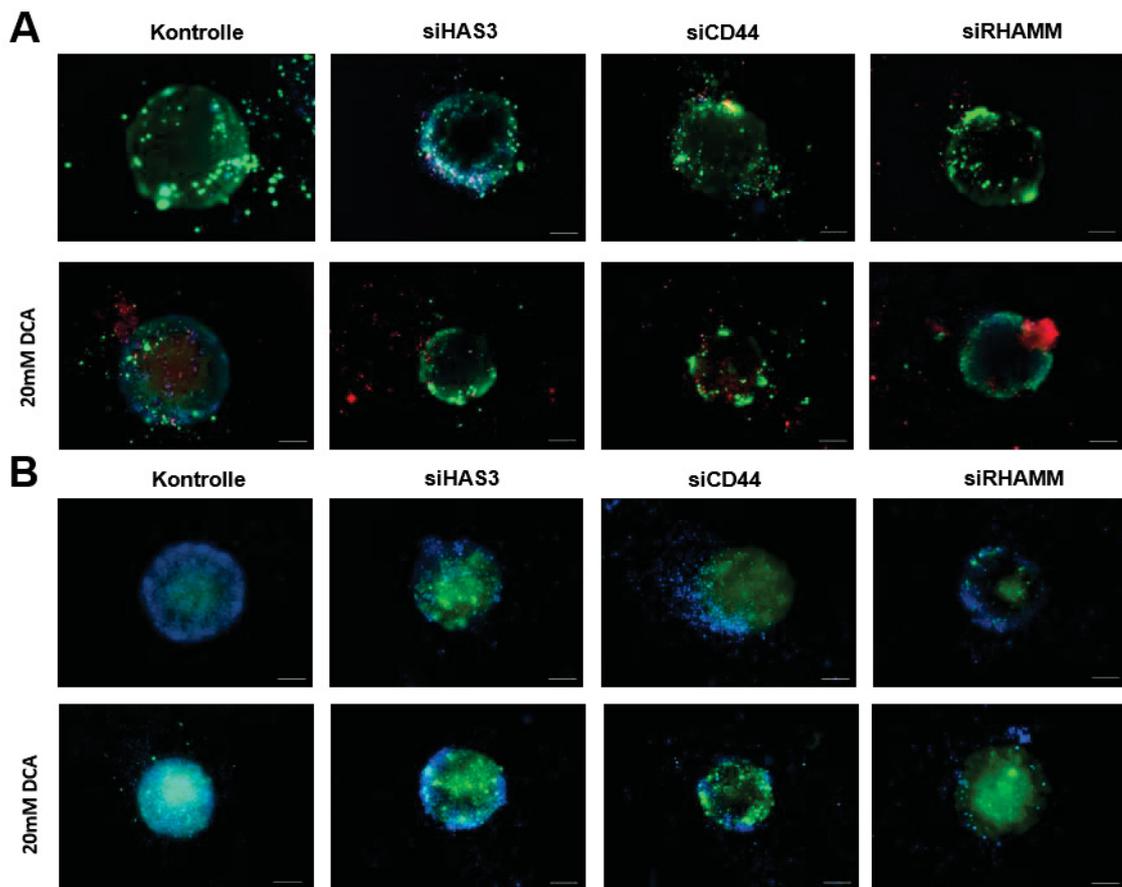


Abbildung 27: Zelltod und Apoptose sind hochreguliert nach siRNA Inhibition von HAS3, CD44 oder RHAMM in Kombination mit DCA

Repräsentative Bilder von 10 Tage alten siRNA-Sphäroiden \pm 20 mM DCA wurden mit **A** Calcein AM, als Marker für proliferierende Zellen (grün), und EthD, als Kennzeichen für tote Zellen (rot), oder auf **C** gespaltene Caspase 3 (orange) gefärbt. Die Kerne wurden mit Hoechst (blau) gegengefärbt. Maßstabsbalken: 200 μ m, n=6 (ein n beinhaltete 8 Sphäroide pro Kondition) [154].

Zusätzlich zur Färbung der Sphäroide wurde eine Zellvitalitätsmessung durchgeführt. Nur die siRNA-Inhibition von CD44 führte zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität. Jedoch ergaben die Kombinationen mit DCA einen statistisch relevanten Verlust der Zelllebensfähigkeit in allen Proben im Vergleich zur Kontrolle.

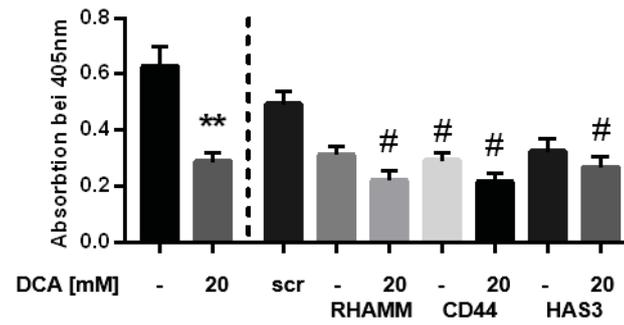


Abbildung 28: Die Zellvitalität ist reduziert nach einer HA-Signalweg-Inhibition in Kombination mit DCA

Die intrazellulären Phosphatasen hydrolysieren p-Nitrophenyl-Phosphat zu p-Nitrophenol und geben damit Aufschluss auf die Zellvitalität. Nachdem SiRNA-Sphäroide für 10 Tage mit oder ohne DCA inkubiert wurden, wurde der APH-Assay durchgeführt. Mittelwerte \pm SEM, n=6 (ein n beinhaltete 16 Sphäroide pro Kondition), one-way ANOVA, **p<0,01; #p<0,05 im Vergleich zur *Scrambled-Kontrolle* [154].

4 Diskussion

In den letzten Jahren rückte der Tumormetabolismus wieder verstärkt in den Fokus der onkologischen Forschung, so auch bei der Therapie des Ösophaguskarzinoms. Diese Neuorientierung erschien notwendig, da trotz verbesserter Therapien und neuartiger Kombinationstherapien nur 45 % der Betroffenen die ersten 5 Jahre überleben, selbst bei einer frühzeitigen Diagnose [110, 120]. Außer der Standardtherapie - einer Kombinations-Chemotherapie aus Cisplatin und 5-Fluoruracil mit anschließender Entfernung des Tumors - stehen nur wenige Alternativen zur Verfügung, so dass bisherige Optionen häufig auf eine palliative Intervention beschränkt sind [112]. Als Zielstruktur für ein Krebsmedikament stellt der Tumorstoffwechsel eine Herausforderung dar, denn aufgrund der verschiedenen Stoffwechselwege, die den Zellen innerhalb eines Tumors zur Verfügung stehen, können sie einen Nährstoffmangel schnell ausgleichen [78, 165]. Daher fanden metabolische Interventionen bisher keine klinische Anwendung bei Ösophaguskarzinomen. Die vorliegende Arbeit präsentiert in diesem Rahmen einen vielversprechenden und zielgerichteten Ansatz für eine neue Therapieoption.

4.1 Identifikation eines neuen Resistenzmechanismus

Diese Arbeit gibt einen Einblick in den engen Zusammenhang zwischen Tumorstoffwechsel und EZM-Regulation. Intensive Forschung zum Warburg-Effekt führte zur Entdeckung der Wirkung von DCA auf die Energiehomöostase in Tumoren [103]. Die Versuche dieser Arbeit bestätigen, dass DCA die anaerobe Glykolyse in KYSE-410-Zellen hemmt. Als Wirkmechanismus wird angenommen, dass DCA die Aktivität der PDK hemmt, was in der Folge zu einer Wiederherstellung der PDC-Aktivität führt, die eine Reaktivierung der Mitochondrien ermöglicht. Daraus resultiert schließlich eine Induktion der Mitochondrien-gesteuerten Apoptose in den behandelten Tumorzellen [96, 125]. Auch konnte in der vorliegenden Arbeit verdeutlicht werden, dass eine DCA-Behandlung dosisabhängig zu einer Reduktion des Zellwachstums von ESCCs führt und gleichzeitig der cPARP-Anteil in diesen Zellen anstieg. cPARP entsteht durch die erhöhte Aktivität von reaktiven Caspasen, die im Laufe einer induzierten Apoptose freigesetzt werden. So zeigen die durchgeführten Versuche, dass durch eine DCA-Behandlung von KYSE-410-Zellen eine mitochondriale Apoptose eingeleitet wird. Gleichzeitig wurde der Effekt von DCA auf nicht-glykolytische Fibroblasten untersucht, um die Spezifität der Behandlung zu beweisen. Die verwendeten DCA-Konzentrationen bewirkten keinen inhibitorischen Effekt auf die Fibroblasten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Stockwin *et al.*, die für eine 50%ige Wachstumsinhibierung von Fibroblasten *in vitro* für DCA eine IC_{50} von 70 mM

errechneten [166]. Die genutzten Konzentrationen von 10, 20 und 40 mM DCA liegen deutlich unter dieser IC_{50} und bewirkten entsprechend keinen wachstumsretardierenden Effekt. Eine Begründung könnte sein, dass bei Stromazellen wie den Fibroblasten, die einen flexiblen Metabolismus haben, DCA einen deutlich schwächeren Effekt hat [166].

Obwohl klinische Studien der DCA ein insgesamt gutes Sicherheitsprofil für die Anwendung am Menschen bestätigen, kann bei höheren Dosen eine periphere Neuropathie auftreten. Da aber eine Reduktion der DCA-Dosis zu einem Effektivitätsverlust führt [113], sind alternative Therapien erforderlich. Eine vielversprechende Zielstruktur bei der Therapie von Tumoren ist die EZM. Ein wichtiger Bestandteil der EZM ist die HA, die in der Vergangenheit mit vermehrter Tumورprogression und Chemoresistenz in Verbindung gebracht worden ist [19]. Einige Resistenzmechanismen, die mit HA assoziiert sind, wurden bereits erforscht und verdeutlichen, dass HA die IC_{50} verschiedener Chemotherapeutika erhöht. Dies geschieht unter anderem durch eine verringerte Permeabilität der Tumormikroumgebung, die zu einer geringeren Interaktion zwischen Wirkstoff und Zielstruktur führt [167-169]. Außerdem fördert die perizelluläre Akkumulation von HA nachweislich das Tumورwachstum, die Metastasierung sowie die Chemotherapieresistenz [161, 162]. Diese Prozesse werden durch HA-Rezeptoren, z.B. CD44 und RHAMM, vermittelt, die starke anti-apoptotische Signalwege auslösen [155, 170, 171].

Um zu untersuchen, ob es einen mechanistischen Zusammenhang zwischen unter DCA auftretenden Resistenzen und der HA-Synthese gibt, wurden zunächst die HA-Produktion und die Expression von HA-assoziierten Genen als Reaktion auf eine DCA-Behandlung von ESCCs untersucht. Dabei konnte ein dosisabhängiger Anstieg der HA-Konzentration sowohl im perizellulären Raum als auch im Überstand festgestellt werden. Dieser Anstieg ging einher mit einer erhöhten mRNA-Expression der HA-abhängigen Proteine wie zum Beispiel der HA-Synthasen. Dies ist plausibel, da das von den HA-Synthasen produzierte HA direkt in die umliegende Tumormikroumgebung extrudiert wird und dort akkumuliert. Nach ihrer Synthese wird die HA an der Zelloberfläche durch die Synthase oder einen der Zelloberflächenrezeptoren wie CD44 oder RHAMM verankert, was zu einer zusätzlichen initialen Verdichtung des perizellulären Raumes führt [172]. Diese Ergebnisse zeigen, dass DCA in Krebszellen HA induzieren kann und deuten damit auf einen bisher unbekanntem Mechanismus für den effizienz-mindernden Effekt von hohen DCA-Dosierungen bei der DCA-Therapie hin.

4.1.1 Zusammenhang zwischen mitochondrialer Respiration und HA-Synthese

Im nächsten Schritt sollte der molekulare Signalweg aufgeklärt werden, der dem neu identifizierten Resistenzmechanismus der Tumorzellen gegen DCA zugrunde liegt. Zunächst wurde der direkte Einfluss der DCA auf den Metabolismus der HA-Vorläufer und ihren Ausgangs-Metaboliten untersucht.

4.1.1.1 DCA-Stimulation führt zu einer Akkumulation der HA-Vorläufer-Metaboliten

Zunächst wurden die einzelnen Metaboliten der Glykolyse näher betrachtet. Eine DCA-abhängige Konzentrationsverschiebung des Pyruvats konnte nicht beobachtet werden. Vorgelagerte Glukose-Metaboliten wie G-6-P wurden jedoch dosisabhängig durch DCA heraufreguliert. Der HA-Vorläufer UDP-Glukuronsäure wird aus G-6-P synthetisiert, so dass eine Akkumulation der G-6-P-Konzentration zu einem Anstieg der HA-Vorläufer führen kann. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen in Muskelzellen, die zeigen, dass DCA die Glykolyse hemmt, was zu einem Anstieg von G-6-P auch in diesem Zelltyp führt [173]. Eine mögliche Erklärung für die DCA-induzierte Hemmung der Glykolyse sind veränderte Enzymaktivitäten oder Expressionslevel der Phosphofruktokinase-1 (PFK1) und -2 (PFK2), welche das Gleichgewicht zwischen G-6-P und Fruktose-6-Phosphat (F-6-P) bestimmen. In dieser Arbeit wurde keine Akkumulation von Pyruvat gefunden; dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich das Gleichgewicht von PFK1 und PFK2 wahrscheinlich zugunsten von PFK2 verschoben hat, so dass als Konsequenz mehr G-6-P produziert wird.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass HA ausschließlich aus den beiden frühen Glukosestoffwechselprodukten G-6-P und F-6-P synthetisiert wird. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass die Substratverfügbarkeit direkt mit dem Umfang der HA-Synthese korreliert [138]; so konnte beispielsweise bewiesen werden, dass die Akkumulation von UDP-Zucker die Hyaluronsäure-Synthese bei Brustkrebs steigert [174]. Interessanterweise wird auch die Synthese anderer Glykosaminoglykane durch die Verfügbarkeit von UDP-GlcNAc moduliert und erweitert die Ergebnisse dieser Arbeit über die Regulierung der HA-Synthese hinaus [175]. Eine weitere interessante Beobachtung in den durchgeführten Experimenten ist, dass ein dosisabhängiger Anstieg der G-6-P- und UDP-GlcNAc-Spiegel, aber kein Anstieg der UDP-Glukuronsäure festgestellt wurde. Dies kann durch eine schnelle Verwendung dieses HA-Vorläufers und eine hohe Aktivität der HAS-Enzyme verursacht werden, die durch die später beschriebenen Mechanismen ausgelöst wurden.

4.1.1.2 Die mitochondriale Respiration ist metabolisch via Acetyl-CoA an die HA-Synthese gekoppelt

Wie eine DCA-Behandlung zu einer erhöhten HA-Produktion führt, kann einerseits durch die Akkumulation von HA-Vorläufern erklärt werden. Andererseits deuten die Ergebnisse dieser Arbeit noch auf einen weiteren, bisher unbekanntem Zusammenhang zwischen den reaktivierten Mitochondrien und der Synthese von UDP-GlcNAc hin. So zeigte sich, dass die Aktivierung des PDC durch DCA zu einem deutlichen Anstieg des mitochondrialen Acetyl-CoA führt, das die OXPHOS antreibt. Acetyl-CoA ist ein zentrales Stoffwechselzwischenprodukt, dessen Konzentration in verschiedenen subzellulären Kompartimenten den allgemeinen energetischen Zustand der Zelle widerspiegelt. Im Allgemeinen wird die Mehrheit des zellulären Acetyl-CoA in der mitochondrialen Matrix im Rahmen des oxidativen Stoffwechsels von glykolytischem Pyruvat, freien Fettsäuren, verzweigten Aminosäuren oder Ketonkörpern innerhalb des TCA-Zyklus verstoffwechselt [176]. Im TCA-Zyklus wird als Zwischenprodukt Zitrat gebildet. Dieses kann über den CiC in das Zytosol zurückgeführt und durch CL in Oxalacetat und zytosolisches Acetyl-CoA umgewandelt werden (Abbildung 29) [177]. Die Hemmung von CL durch entweder Interferenz-RNA oder pharmakologische Inhibitoren führen zu einem Wachstumsstillstand bei Tumorzellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [176, 178]. Im menschlichen Lungenadenokarzinom korreliert die Expression von phosphoryliertem CL positiv mit Progressionsstadium, Differenzierungsgrad und Prognose [179]. Eine direkte Verbindung zwischen der Reaktivierung des TCA-Zyklus und eine daraus resultierende Akkumulation des zytosolischen Acetyl-CoA und der HA-Vorläufer oder der HA-Synthese waren bis zu dem Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit unbekannt. In der Literatur beschrieben war lediglich, dass Glucosamin-6-Phosphat-N-Acetyltransferase 1 (GNA1) die Übertragung einer Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf Glucosamin-6-Phosphat katalysiert, welches ein Zwischenprodukt in der HA-Vorläufer UDP-GlcNAc-Biosynthese ist (Abbildung 29) [180], jedoch war der Ursprung des Acetyl-CoA für diese Reaktion unbekannt. Basierend auf dieser Grundlage wurde auch in den KYSE-410-Zellen unter Stimulation mit DCA die Acetyl-CoA-Konzentration untersucht. Die Acetyl-CoA-Menge stieg dosisabhängig durch die DCA-Behandlung an. Dieser Effekt konnte durch Hemmung der CL vollständig aufgehoben werden. Darüber hinaus führte die Hemmung des zytosolischen Acetyl-CoA durch DCA zu einer Inhibition des Resistenzmechanismus. Die Induktion der HA-Synthese durch DCA kann durch den Inhibitor auf das Niveau der unbehandelten Zellen herabgesenkt werden. Daraus resultiert, dass das durch die Reaktivierung der Mitochondrien produzierte Acetyl-CoA direkt in die Herstellung neuer HA-Vorläufer fließt und damit die HA-Synthese weiter antreibt. Dieser neu identifizierte

Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Respiration und der HA-Synthese bietet eine mechanistische Erklärung für den HA-vermittelten DCA-induzierten Resistenzmechanismus von Tumorzellen.

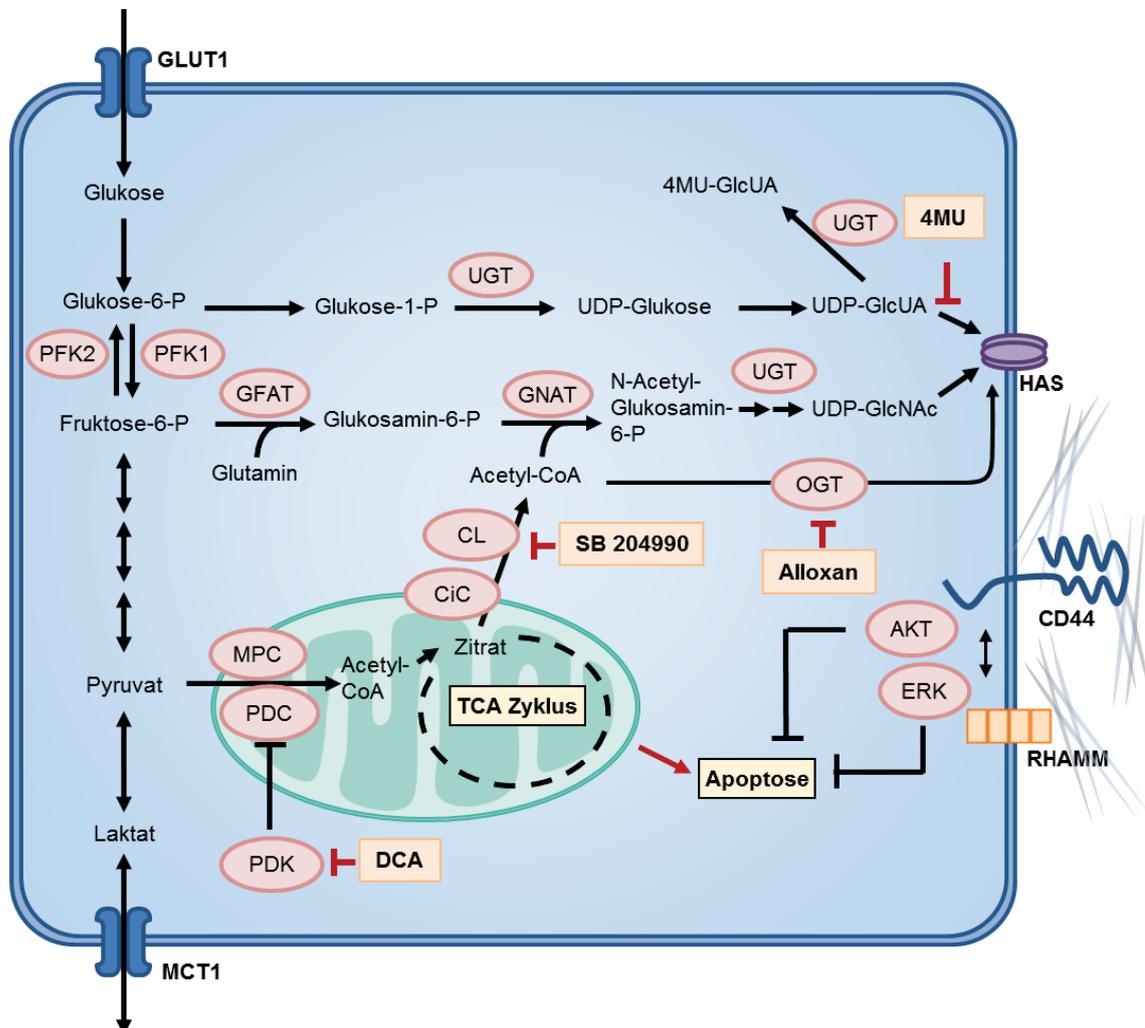


Abbildung 29: Schematisches Model der metabolischen Interaktion zwischen Glykolyse, mitochondrialer Respiration und Hyaluronsäure-Synthese

Glukose wird durch den Glukose-Transporter (z.B. GLUT1) in die Zelle aufgenommen und in der Glykolyse metabolisiert. Das entstandene Pyruvat wird durch den mitochondrialen Pyruvat-Transporter (MPC) in die Mitochondrien befördert und dort zu Acetyl-CoA umgewandelt. Diese Reaktion wird durch das Enzym Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) katalysiert. Die Aktivität der PDC wird von der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK) reguliert. Das Acetyl-CoA wird in den Mitochondrien weiter im Tricarbonsäurezyklus (TCA) zur ATP-Produktion verwendet. In den meisten Krebszellen ist dieser Signalweg inaktiv aufgrund einer Hochregulierung der PDK und einer daraus resultierenden Inhibition der PDC. Dieser Effekt ist charakteristisch für hypoxische Konditionen, wird jedoch auch in Tumorzellen in der Anwesenheit von Sauerstoff beobachtet. Dabei wird das vorhandene Pyruvat zu Laktat reduziert und anschließend durch den Monocarboxylat-Transporter (z.B. MCT1) exportiert. Eine

Inhibition der PDK durch DCA führt zu einer Wiederherstellung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS). Infolgedessen steigt die Zitrat-Konzentration in den Mitochondrien. Das Zitrat wird dann vom Zitrat-Carrier (CiC) ins Zytosol transportiert und von der ATP-Zitrat-Lyase (CL) zu Acetyl-CoA umgewandelt. Die Reaktivierung der mitochondrialen Respiration scheint zu einer Initiierung Caspase-abhängiger Apoptose in Krebszellen zu führen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese Aktivierung auch einen Anstieg der HA-Vorläufer N-Acetyl-Glucosamin-Phosphat und Glukose-6-Phosphat (G-6-P) hervorbringt. Die Phosphofruktokinase 1,2 (PFK1,2) katalysieren das Gleichgewicht zwischen G-6-P und Fruktose-6-Phosphat (F-6-P). Zusätzlich wurde eine Hochregulierung der O-GlcNAc-Transferase (OGT) vermittelten GlcNAcysierung von Proteinen (z.B. HAS) beobachtet. Beides resultiert in einer Erhöhung der extrazellulären HA-Konzentration, die dann eine verstärkte CD44- und RHAMM-vermittelte Signaltransduktion und somit eine Inhibition der Apoptose zur Folge hat. Die Hyaluronsäure-Synthese kann durch 4-Methylumbelliferon (4-MU) blockiert werden, wodurch das anti-apoptotische Signal unterbunden wird (angepasst aus [154]).

4.1.2 DCA induziert die O-GlcNAcysierung von Proteinen

Neben der Bereitstellung von Vorläufer-Molekülen für die HA-Synthese verfügt UDP-GlcNAc auch über das Potential, die HA-Synthese durch post-translationale Mechanismen zu induzieren [137]. Dabei werden O-gekoppelte N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc)-Einheiten an zytoplasmatische, nukleare und mitochondriale Proteine gebunden. Die O-GlcNAcysierung ist damit eine post-translationale Modifikation, die die grundlegenden zellulären Prozesse reguliert. Trotz ihrer Häufigkeit ist die Glykosylierung von Proteinen eine der am wenigsten verstandenen Arten von post-translationalen Modifikationen [181]. So orchestriert die O-GlcNAcysierung eine Vielzahl von zellulären Prozessen als Reaktion auf glykolytische Aktivität, einschließlich der Regulierung der Genexpression und Methylierung, des Zellzyklus, der Zytokinese und des Zytoskeletts. Sie wird durch zellulären Stress induziert und vermittelt Schutz vor zellulären Schäden, z.B. durch die Regulierung von DNA-Reparaturmechanismen. Darüber hinaus ist die O-GlcNAcysierung auch ein wichtiger Faktor, der den Stoffwechsel mit der epigenetischen Regulation verbindet [182]. Bemerkenswert ist, dass O-GlcNAcysierung und Phosphorylierung bei der Proteinaktivierung zusammenwirken und auch ein *Feedback-Cross-Talk* zwischen den beteiligten regulierenden Enzymen besteht. Eine Erhöhung der O-GlcNAcysierung fördert mehrere altersbedingte chronische Krankheiten, z.B. Diabetes, neurodegenerative Erkrankungen und Krebs [183]. Da Krebszellen die Aufnahme von Glukose forcieren, erhöht sich die gesamte O-GlcNAcysierung durch Steigerung der O-GlcNAc-Transferase (OGT)-Aktivität und/oder Senkung der O-GlcNAc-Konzentration. Die Reduzierung der O-GlcNAcysierung hemmt die Tumorgenese [181]. Es konnte bewiesen werden, dass O-GlcNAcysierung die Glykolyse in Krebszellen über den HIF-

1 α und sein transkriptionelles Ziel, GLUT1, reguliert wird. Humane Brustkrebsarten mit einem hohen Anteil an HIF-1 α überexprimieren erhöhte OGT-Konzentrationen; dies korrelieren mit einem schlechten Krankheitsverlauf [184]. Da DCA die Konzentration von Acetyl-CoA und UDP-N-Acetylglukosamin erhöht, konnten damit erste Indizien gefunden werden, dass DCA auch einen Effekt auf die O-GlcNAcysierung von Proteinen hat. Entsprechend wurde in dieser Arbeit mittels Immunohistochemie und Immunoblot die O-GlcNAcysierte Proteinfraction untersucht. Mit diesen Analysemethoden konnte ein dosisabhängiger Anstieg der modifizierten Proteine durch DCA festgestellt werden. Damit konnte ein weiterer metabolischer Vorteil der Krebszellen als Reaktion auf die Behandlung von DCA identifiziert werden, der im engen Zusammenhang mit den HA-Vorläufern steht.

4.1.2.1 O-GlcNAc fungiert als Nährstoffsensor

Zusätzlich zur HAS-Aktivierung durch die O-GlcNAcysierung hat diese post-translationale Modifikation auch andere Funktionen. Die Rolle der O-GlcNAcysierung als nährstoffabhängiger Regulator der Zellfunktionen wurde kürzlich in einem umfassenden Überblick zusammengefasst [190]. Die Konzentration von UDP-GlcNAc in Zellen reagiert in hohem Maße auf Nährstoffe und Stoffwechselfvorgänge durch die wichtigsten metabolischen Prozesse. Dies geschieht über ihre enge Verbindung zum Glukose-, Stickstoff-, Nukleotid- und Fettsäuremetabolismus. UDP-GlcNAc gilt als idealer Sensor für den Stoffwechselstatus der Zelle, da es Glukose, Glutamin, Acetyl-CoA und Uridintriphosphat (UTP) benötigt, um synthetisiert zu werden. Unter anderem verändern Hyperglykämie und -insulinämie die O-GlcNAcysierung oder Expression vieler O-GlcNAc-modifizierter Proteine qualitativ und quantitativ, da sie zu einer Verschiebung der Substrate führen [191, 192].

Da die Vorläufer von HA, G-6-P und F-6-P aus früheren Schritten der Glykolyse stammen, stehen diese in einem engen Zusammenhang. Das durch PFK vermittelte Gleichgewicht von G-6-P und F-6-P kann direkt korreliert werden mit der Substratverfügbarkeit für UDP-GlcNAc oder O-GlcNAcysierung. Es konnte so auch bewiesen werden, dass die O-GlcNAcysierung am Serin 529 der PFK1 erhöht ist, wodurch das Enzym gehemmt und der Glukosefluss über den Pentosephosphatweg umgeleitet wird. Dieser Stoffwechselschalter verleiht den Krebszellen einen selektiven Wachstumsvorteil [183].

4.1.2.2 O-GlcNAcysierung und transkriptionelle Regulation der HA-Synthesen

Ähnlich wie bei anderen Arten von post-translationalen Modifikationen hat sich gezeigt, dass O-GlcNAc die Aktivität vieler Proteine beeinflusst, einschließlich Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Kernporenproteinen [185-187]. Neben der beobachteten metabolischen Stimulation der HA-Synthese über ein erhöhtes Angebot an Vorläufern und der post-translationalen Aktivierung durch O-GlcNAcysierung waren auch transkriptionelle Veränderungen an der Erhöhung der HA-Synthese unter DCA-Behandlung beteiligt. So zeigte sich in den durchgeführten Experimenten, dass die an der HA-Synthese (HAS2, HAS3), dem Katabolismus (HYAL1, HYAL2) und der Signalisierung (CD44, RHAMM) von HA beteiligten Proteine durch DCA hoch reguliert wird. Dieser Effekt ist entweder auf eine positive transkriptionelle *Feedbackschleife*[138] oder auf einen direkten Einfluss der Stoffwechselveränderungen durch DCA auf die Aktivität der jeweiligen Genpromotoren zurückzuführen. So wurde in humanen Keratinozyten gezeigt, dass der Has2-Promotor funktionelle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren CREB1, RAR, SP1, STAT und YY1 enthält. Wird nun der UDP-GlcNAc-Gehalt in Keratinozyten durch Fütterung mit Glucosamin erhöht, führt dies zu einer Reduktion der Has2-Expression um ~50%. Im Gegensatz dazu reduzierte die Fütterung mit Mannose den zellulären UDP-GlcNAc-Gehalt und erhöhte gleichzeitig die Has2 mRNA. Die Untersuchung der Glucosamin-induzierten Veränderungen der an den Has2-Promotor gebundenen Transkriptionsfaktoren führt zu einer Akkumulation von YY1. Die Behandlung mit Mannose reduziert die Promotorbindung von SP1 [138]. Diese Studien verdeutlichen, dass veränderte Konzentrationen von HA-Vorläufern die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Has-Promotoren und damit die Has-Transkription beeinflussen können.

Über metabolische Effekte auf die HAS-Transkription ist wenig bekannt, allerdings wurde beschrieben, dass ein Rückgang der Energiehomöostase in humanen glatten Muskelzellen eine Reduktion der HAS2-Expression über die AMP-Kinase verursacht [175]. Tatsächlich wird ein großes Ausmaß an O-GlcNAcysierung in Brustkrebszellen gefunden, das mit dem Niveau der HAS-Enzyme, der Ansammlung von Hyaluronsäure und der schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden kann. Das hohe Ausmaß der zytoplasmatischen O-GlcNAcysierung korreliert mit einer hohen Konzentration von HA [188]. Insbesondere für HAS3, die vorherrschende Isoform der in dieser Arbeit verwendeten ESCC-Zelllinie, wird berichtet, dass die zytosolische Konzentration von UDP-Glukuronsäure und UDP-GlcNAc ihre Aktivität reguliert, indem sie das *Shuttling* dieser Isoform vom Golgi zur Plasmamembran koordiniert und die O-GlcNAcysierung

in Melanomzellen erleichtert [189]. Die starken positiven Korrelationen zwischen dem Ausmaß der O-GlcNAcysierung und dem HAS-Gehalt deuten darauf hin, dass der Anstieg der Konzentration der HAS-Proteine auf ihre Stabilisierung durch O-GlcNAcysierung zurückzuführen ist [188]. Diese Wirkung auf HA ist auf die O-GlcNAcysierung von Serin 221 zurückzuführen, die das Enzym in der Membran stabilisiert. Die HA-Synthasen haben aufgrund ihres Abbaus durch das 26S Proteasom einen sehr schnellen Umsatz mit einer berechneten Halbwertszeit von 17 min. Dieser kann durch die Glykolytierung auf 5 Std erhöht werden [175]. Zusammengefasst induziert DCA die Produktion von HA einerseits durch eine Akkumulation der HA-Vorläufer und andererseits durch die Aktivierung der O-GlcNAcysierung, die die Aktivität der HA-Synthasen verstärkt.

4.2 Die Kombinationstherapie aus DCA und 4-MU zeigt einen synergistischen antiproliferativen Effekt auf ösophagealen Tumorzellen

Um den metabolischen Resistenzmechanismus der HA-Synthese-Aktivierung zu überwinden, wurde eine pharmakologische Hemmung der HA-Matrixsynthese durch die niedermolekulare Verbindung 4-MU in Kombination mit einer DCA-Behandlung getestet. Sollte die Verwendung von 4-MU zusammen mit DCA die Effizienz der Anti-Tumorthherapie verstärken, würde dies neue Möglichkeiten in der Bekämpfung von glykolytischen Krebsarten eröffnen.

4.2.1 Die Kombinationstherapie zeigt eine hohe Wirksamkeit auf ösophagealen Tumorzellen

Die Wirksamkeit von 4-MU im Hinblick auf die Wachstumsreduktion ist in einer Vielzahl von Tumorzelllinien gut dokumentiert. Im Tierversuch konnte belegt werden, dass 4-MU die Tumorprogression von z.B. Ösophagus-Plattenepithelkarzinomzellen [124, 139], Hepatomzellen [193], Blasenkrebszellen [194] und Prostatakrebszellen [195] inhibiert. Mehrere klinische Studien, einschließlich randomisierter Placebo-kontrollierter Studien, ergaben eine hohe Sicherheit bei der kurzfristigen Verabreichung von Hymecromon in zugelassenen Dosen [196, 197]. Die Verwendung von 4-MU führte der Literatur entsprechend auch in den hier durchgeführten Experimenten zu einer Akkumulation von UDP-Glukuronsäure. Dies lässt auf eine Anhäufung des Vorläufer-Zuckers durch die irreversible Hemmung der UDP-Glukuronsäuresynthese schließen. Dadurch steht die Glukuronsäure für die HA-Synthasen nicht mehr zur Verfügung und kann nicht mehr in GAG-Kette eingebaut werden. Die in dieser Arbeit beobachtete verringerte HA-Menge unter einer Behandlung mit 4-MU bestätigt das primäre

Wirkprinzip von 4-MU auf die HA-Synthese. Im Hinblick auf das Zellwachstum zeigte sich, dass 4-MU auch hier eine Zellwachstumsreduktion induzierte und die Sphäroidvolumenzunahme abschwächte. Die Kombinationstherapie verstärkte signifikant diesen Anti-Tumor-Effekt auf die ESCC-Zellen. Verglichen mit den Basalwerten kam es zu keiner weiteren Zunahme der Zellzahl bzw. im Fall der Sphäroide sogar zu einer Verringerung der Größe unter das Startvolumen.

Diese Ergebnisse konnten auch in einem Maus-Tumor-Xenograft-Regressionsmodell validiert werden [154]. Alle Behandlungen führten zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens im Vergleich zur Placebokontrolle. Allerdings führte nur die Kombinationstherapie zu einem anhaltenden Wachstumsstillstand der Tumor-Xenografts und zu einer makroskopisch nachweisbaren Zerstörung von Tumorgewebe. Im Einklang mit den *in vitro*-Experimenten ergaben histologische Färbungen eine Erhöhung der HA-Deposition in der DCA-behandelten Gruppe, die in den 4-MU-behandelten Gruppen aufgehoben wurde. Auch hier zeigte die Kombinationsbehandlung von DCA und 4-MU die stärkste Hemmung der Zellproliferation. Interessanterweise führte nur die Kombinationstherapie zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl der apoptotischen Zellen. Zusammengenommen zeigten diese Experimente, dass die Kombination von DCA und 4-MU eine sichere und effektive Behandlungsoption für Speiseröhrenkrebs *in vivo* sein kann [154].

Die Wirksamkeit von 4-MU in Kombination mit anderen Krebstherapeutika wurde bereits bewiesen. So erhöht 4-MU die Effektivität von 5-FU auf Pankreaskrebszellen *in vitro* und *in vivo* [198]. Außerdem konnte eine antiproliferative Aktivität in malignen pleuralen Mesotheliomzellen zusammen mit dem mitogen-aktivierten Proteinkinase (MEK)-Inhibitor Trametinib nachgewiesen werden [199]. Eine andere Studie zeigte, dass 4-MU durch eine Verringerung der HA-vermittelten tumorprotektiven Wirkung die Empfindlichkeit der Doxorubicin-Behandlung bei chronisch myelogener Leukämie erhöhen konnte [200].

Eine andere interessante Beobachtung in der vorliegenden Arbeit ist, dass die siRNA-Inhibition von HAS3 zu einer höheren tumorsuppressiven Wirkung von DCA führte als die Verminderung der Expression von CD44 und RHAMM. Zwar sind alle drei HA-assoziierten Proteine mit einer schlechten Prognose und Gesamtüberlebensdauer in Verbindung gebracht worden [155, 201, 202], jedoch kann durch die Inhibition der Rezeptoren nur die jeweilige Signalweiterleitung gehemmt werden, aber die Synthese des aktivierenden Liganden HA wird nicht gestört. Ein *Silencing* von HAS3, der Haupt-HA-Synthase in den ESCC-Zellen, verringert die HA-Produktion und damit auch die nachgeschaltete Signaltransduktion über die Rezeptoren [139]. Da die Werte der

siHAS3-Zellen mit den Ergebnissen der 4-MU behandelten Zellen korrelieren, kann der wachstumsretardierende Effekt direkt auf die Inhibition der HA-Synthese durch 4-MU zurückgeführt werden. Inhibition von CD44 und RHAMM führt zu einem abgeschwächten Ergebnis im Vergleich zu siHAS3. Dies unterstützt die Hypothese, dass eine direkte Inhibition der HA-Synthese eine effizientere Therapieoption sein könnte als die Abschwächung der Signalweiterleitung über die Inhibition von CD44 und RHAMM.

4.2.2 DCA und 4-MU wirken synergistisch

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Mechanismus charakterisiert, der einen Zusammenhang zwischen OXPHOS und der erhöhten Synthese von HA verdeutlicht. In einem nächsten Schritt wurde dieser die Tumoresistenz fördernde Mechanismus gezielt inhibiert, indem die Aktivität des anti-apoptischen HA-Systems gehemmt wurde.

Ein therapeutischer Synergismus liegt vor, wenn eine Kombinationsbehandlung eine verbesserte Therapie im Vergleich zur besten Einzeltherapie bietet. Auf Grundlage dieser Definition ist es möglich, experimentelle Untersuchungen zu entwickeln, um synergistische Kombinationen zu erkennen [203]. Der resultierende Kombinationsindex-(CI) von Chou-Talalay bietet eine quantitative Definition für additive Wirkung ($CI = 1$), Synergismus ($CI < 1$) und Antagonismus ($CI > 1$) in Medikamentenkombinationen [150]. Es ist zu beachten, dass neben Dosierungskombination, das Stimulierungsintervalls, die sequenzielle Behandlung und auch die pharmazeutische Konfektionierung die Wirkung der Medikamentenkombination beeinflussen kann [204]. DCA wurde bereits im Zusammenhang mit anderen Anti-Krebs Therapien auf Wirksamkeitssynergismen untersucht. DCA demonstrierte in Kombination mit Salinomycin, einem Polyether-Antibiotikum [205], platinbasierten Medikamenten, Carboplatin, Satraplatin, JM118 und Oxoplatin [206], und Metformin [207] sowie noch einigen anderen Substanzen einen therapeutischen Synergismus. Jedoch wurde DCA nur als Wirkverstärker schon bestehender Krebsmedikamente und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, hinsichtlich des eigenen Wirksamkeitsverlusts untersucht.

Die tumorsuppressive Wirkung von DCA beruht auf einer Reaktivierung der mitochondrialen Atmung der Krebszellen, die einen Efflux von Zytochrom C sowie anderer proapoptischer Moleküle aus den Mitochondrien zur Folge hat, wodurch die Apoptose der Zellen induziert wird [125]. Die Effektivität der DCA wird durch den Resistenzmechanismus gehemmt, da HA zur Aktivierung von tumorprotektiven Signalwegen führt [161, 162]. Neben der HA-Synthese-Inhibition kann 4-MU zur

Induktion der Apoptose durch PARP-Degradierung und zum Verlust des Membranpotenzials der Mitochondrien führen. Dadurch führt 4-MU zu einer Erhöhung der *p53*-mRNA-Expression und der mitochondrial induzierten Apoptose [56]. Durch eine Kombinationstherapie kommt es durch eine Hemmung des HA-vermittelten Resistenzmechanismus, so dass die Wirkung der DCA nicht weiter abgeschwächt wird. Zusätzlich kommt es zu einem Verlust der tumor-protectiven Signalwege via CD44 und RHAMM. Dieser Zusammenhang erklärt den Synergismus der beiden Therapien und sollte in zukünftigen klinischen Studien weiter untersucht werden.

4.2.3 DCA ist effektiver in 3D- als in 2D-Zellkulturen

Interessanterweise zeigte sich in den Versuchen in dieser Arbeit, dass gleiche DCA-Konzentrationen in 3D-Versuchen eine höhere Effektivität aufwiesen als in 2D-Kulturen. In 3D-Zellkulturen führte die DCA-Behandlung innerhalb kurzer Zeit zu einer signifikanten Volumenreduktion und zu einer Induktion der Apoptose. Dies deckt sich mit Berichten, dass DCA eine unterschiedliche Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* haben könnte [164]. Die Vorteile von 2D-Kulturen sind mit einer einfachen und kostengünstigen Erhaltung der Zellkultur und der Durchführung von funktionellen Tests verbunden. Leider haben adhärente Kulturen auch zahlreiche Nachteile. 2D-kultivierte Zellen ahmen nicht die natürlichen Strukturen von Geweben oder Tumoren nach, die besonders bei Untersuchungen der Tumormatrix wichtig sind. Bei dieser Kulturmethode werden zelluläre und extrazelluläre Wechselwirkungen nicht so dargestellt, wie sie in der Tumormasse vorhanden wären. Diese Wechselwirkungen sind verantwortlich für Zelldifferenzierung, Proliferation, Vitalität, Expression von Genen und Proteinen, Reaktionsfähigkeit auf Stimuli, Medikamentenstoffwechsel und andere Zellfunktionen [208, 209]. Das Konzept der 3D-Strukturen basiert auf der Etablierung von sphäroidischen Strukturen, in denen Zellen verschiedene Schichten bilden. Diese Struktur imitiert die physikalischen und biochemischen Eigenschaften einer soliden Tumormasse. Mittels 3D-Zellkulturmodellen können *in vivo* Gewebestrukturen in einer kleinstmöglichen Skalierung nachgebildet werden und damit einfach untersucht werden [210]. Im Vergleich von 2D- und 3D-Zellkulturen in der vorliegenden Arbeit demonstrierten die Sphäroide eine starke Hochregulation der Expression von PDK und LDHA, was darauf hindeutet, dass die Glykolyse in diesem Modell aktiver ist, was eher der physiologischen Tumorentwicklung entspricht. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tatsache, dass multizelluläre Tumor-Sphäroide als repräsentativeres Modell für die Hypoxie bei soliden Tumoren angesehen werden, eine Bedingung, die mit der Aktivierung der aeroben Glykolyse verbunden ist [211]. Darüber hinaus wurde mit den durchgeführten Untersuchungen erstmals gezeigt, dass 3D-Wachstum auch

eine starke transkriptionelle Induktion von HAS3 verursacht. Dies kann die Folge einer verstärkten Synthese der Tumormatrix sein, wird aber wahrscheinlich auch einen wichtigen Überlebensfaktor in der fortgeschrittenen Karzinogenese darstellen. Tatsächlich führte nur das Hemmen beider Signalwege über Glykolyse und HA mit der Kombination von DCA und 4-MU zu einer Verkleinerung der Tumor-Sphäroide unterhalb des Anfangsvolumens. Zusammengenommen deuten die Daten darauf hin, dass die Interaktion zwischen EZM und Tumormetabolismus von wesentlicher Bedeutung für die Karzinogenese ist.

4.3 Limitationen und Ausblick

Eine Einschränkung dieser Arbeit ist, dass die Ergebnisse mit nur einer Tumorzelllinie erzielt wurden. Jedoch wurden die Auswirkungen von DCA auf die Reaktivierung der Mitochondrien und die nachfolgende Hemmung des Tumorwachstums bereits in einer Vielzahl von Tumormodellen *in vitro* und *in vivo* gezeigt [212-216]. Da die wiederhergestellte mitochondriale Aktivität höchstwahrscheinlich zu einer erhöhten Acetyl-CoA-Produktion im Allgemeinen führt, wird der beschriebene Mechanismus voraussichtlich auch für andere Zelltypen gültig sein. Da 4-MU auch bei einer Vielzahl von Tumorzelltypen die HA-Synthese und damit das Tumorwachstum hemmen kann [124, 154, 217, 218], kann davon ausgegangen werden, dass es den gleichen Synergismus mit DCA auch in anderen Zelltypen aufweisen würde. Zur Verifizierung sollte dieses Konzept in anderen Tumorentitäten und -modellen überprüft werden.

Noch zu beweisen ist der Effekt von der O-GlcNAcysierung auf die Aktivierung der HA-Synthasen. Die durchgeführten Versuche bewiesen zwar, dass die O-GlcNAcysierung durch DCA erhöht wird, jedoch konnte bis jetzt noch keine zielgerichtete Aktivierung der HA-Synthasen demonstriert werden. Um dies zu untersuchen, müsste die intrazelluläre HAS-Fraktion isoliert und dann der prozentuale Anteil der O-GlcNAcysierten HA-Synthasen durch eine sogenannte *Peptide-Pull-Down-Analyse* quantifiziert werden.

Im Hinblick auf neue Strategien zur Krebstherapie zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die HA-vermittelte Tumorresistenz durch 4-MU wirksam bekämpft werden kann und 4-MU deshalb ein vielversprechender Partner im Rahmen der metabolischen Krebstherapie werden könnte (Abbildung 29). Da 4-MU in vielen Ländern für biliäre Dyskinesie zugelassen ist, können die Ergebnisse dieser Arbeit in zukünftigen klinischen Studien verwendet werden, um den therapeutischen Wert dieser Kombination für die metabolische Krebstherapie zu testen. Damit bilden die Ergebnisse dieser Arbeit die Grundlage für weitere Untersuchungen über die Auswirkungen des

Tumorstoffwechsels auf die Tumormikroumgebung und für die Erprobung dieser Kombination in klinischen Studien.

5 Schlussfolgerung

DCA hat in den vergangenen Jahren in der wissenschaftlichen Fachwelt große Aufmerksamkeit erregt, da es selektiv Apoptose in Krebszellen induziert und dabei wenig Effekt auf das umliegende Gewebe ausübt. Obwohl klinische Studien ein insgesamt gutes Sicherheitsprofil von DCA beim Menschen bestätigen, erweist sich die periphere Neuropathie als die wichtigste Nebenwirkung, die oft eine Dosisreduktion erfordert, was zu einem Verlust der Wirksamkeit führt. Um einen möglichen Resistenzmechanismus unter Einbeziehung der Tumormikroumgebung zu identifizieren, wurden die Auswirkungen einer DCA-induzierten mitochondrialen Reaktivierung auf das anti-apoptotische HA-System untersucht. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass die durch die reaktivierte OXPHOS induzierten Stoffwechselveränderungen zu einer ausgeprägten Aktivierung der HA-Matrixbildung führten. Dies geschieht durch eine Erhöhung des HA-Vorläuferpools und der O-GlcNAcysierung von Proteinen wie der HA-Synthase, was wiederum das Überleben der Tumorzellen unterstützt. Zusätzlich wurde zum ersten Mal eine direkte Verbindung zwischen dem mitochondrialen TCA-Zyklus und der Synthese von UDP-GlcNAc über zytosolisches Acetyl-CoA nachgewiesen.

Dieser Resistenzmechanismus kann durch den oral verfügbaren HA-Synthese-Inhibitor 4-MU gehemmt werden, der eine starke synergistische Wirkung mit DCA aufwies. Die Synergie dieser Medikamenten-Kombinationen kann auf die Verbindung der beiden inhibierten Signalwege und die Hemmung des sich hieraus ergebenden Resistenzmechanismus erklärt werden. So wird durch DCA eine mitochondrial-induzierte Apoptose aktiviert und durch 4-MU werden die HA-vermittelten Tumorprotektiven Signalwege unterbunden. Zusätzlich wird durch eine HA-arme EZM die Diffusion von Chemotherapeutika erleichtert und die effektive Dosis verringert.

Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Kombination dieser beiden oral verfügbaren Substanzen mit einem guten Sicherheitsprofil am Menschen in klinischen Studien weiter untersucht werden sollte. Diese Überlegungen könnten auch für andere Pathologien wie septischen Schock [219], Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie [103] sowie pulmonale arterielle Hypertonie und andere Krankheiten gelten [220]. Zusätzlich können die hier aufgeklärten Mechanismen über eine erhöhte O-GlcNAcysierung von Proteinen auch Folgen für zelluläre Prozesse über die HA-Matrix-Regulation hinaus haben.

6 Summary

Aerobic glycolysis is a unique feature of tumor cells that entails several advantages for cancer progression such as resistance to apoptosis. The small molecular compound Dichloroacetate (DCA) is a pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) inhibitor, which restores oxidative phosphorylation and induces apoptosis in a variety of cancer entities. However, clinical studies have shown that its therapeutic effectiveness is limited by insufficient therapeutic efficacy and dose-dependent side effects as is observed with other metabolic approaches. Further research is needed to identify the underlying mechanisms as a basis for the development of concepts and drugs that allow overcoming these limitations. This work focused on the hyaluronan rich tumor microenvironment, which supports tumor survival by activation of anti-apoptotic signaling cascades via HA receptors. Elevated N-acetyl-glucosamine and glucose-6-phosphate levels in response to mitochondria reactivation were identified as a cause for a dose-dependent activation of the HA system under DCA treatment. Based on this finding, the combination of DCA with the HA synthesis inhibitor 4-Methylumbelliferon (4-MU) was evaluated for enhancing its efficacy in 2D and 3D cell cultures. The results show that HA synthesis inhibition exhibits pronounced synergistic actions with DCA treatment on esophageal tumor cell proliferation and survival suggesting the combination of these two strategies as an effective anticancer therapy. These findings lay the basis for further research on the impact of tumor metabolism on the tumor microenvironment and for testing this combination in clinical studies.

7 Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(3): p. 309-22.
2. Sugimoto, H., et al., *Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment*. *Cancer Biol Ther*, 2006. **5**(12): p. 1640-6.
3. Nieman, K.M., et al., *Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth*. *Nat Med*, 2011. **17**(11): p. 1498-503.
4. Wang, R., et al., *Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium*. *Nature*, 2010. **468**(7325): p. 829-33.
5. Cooke, V.G., et al., *Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(1): p. 66-81.
6. Lv, L., et al., *The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e18219.
7. Qin, Z., et al., *B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity*. *Nat Med*, 1998. **4**(5): p. 627-30.
8. Mecham, R., *The Extracellular Matrix: an Overview*. 2011: Springer Berlin Heidelberg.
9. Coppe, J.P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. *Annu Rev Pathol*, 2010. **5**: p. 99-118.
10. Freund, A., et al., *Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences*. *Trends Mol Med*, 2010. **16**(5): p. 238-46.
11. Nelson, C.M., et al., *Tissue geometry determines sites of mammary branching morphogenesis in organotypic cultures*. *Science*, 2006. **314**(5797): p. 298-300.
12. Wang, T., et al., *Extracellular matrix stiffness and cell contractility control RNA localization to promote cell migration*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 896.
13. Wei, S.C., et al., *Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway*. *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(5): p. 678-88.
14. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. *N Engl J Med*, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
15. Theocharis, A.D., et al., *Extracellular matrix structure*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. **97**: p. 4-27.
16. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(35): p. 25085-92.
17. Turley, E.A., P.W. Noble, and L.Y. Bourguignon, *Signaling properties of hyaluronan receptors*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4589-92.
18. Csoka, A.B., S.W. Scherer, and R. Stern, *Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31*. *Genomics*, 1999. **60**(3): p. 356-61.

19. Heldin, P., et al., *Deregulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer*. J Biochem, 2013. **154**(5): p. 395-408.
20. Junliang, L., et al., *High-molecular-weight hyaluronan produced by activated pancreatic stellate cells promotes pancreatic cancer cell migration via paracrine signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2019. **515**(3): p. 493-498.
21. Zhang, Z., et al., *Hyaluronan synthase 2 expressed by cancer-associated fibroblasts promotes oral cancer invasion*. J Exp Clin Cancer Res, 2016. **35**(1): p. 181.
22. Erickson, M. and R. Stern, *Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism*. Biochem Res Int, 2012. **2012**: p. 893947.
23. Stern, R., A.A. Asari, and K.N. Sugahara, *Hyaluronan fragments: an information-rich system*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(8): p. 699-715.
24. Camenisch, T.D., et al., *Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme*. J Clin Invest, 2000. **106**(3): p. 349-60.
25. Lv, L., et al., *Upregulation of CD44v6 contributes to acquired chemoresistance via the modulation of autophagy in colon cancer SW480 cells*. Tumour Biol, 2016. **37**(7): p. 8811-24.
26. Kodama, H., et al., *Prognostic impact of CD44-positive cancer stem-like cells at the invasive front of gastric cancer*. Br J Cancer, 2017. **116**(2): p. 186-194.
27. Orian-Rousseau, V., et al., *Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(1): p. 76-83.
28. Subramaniam, V., et al., *CD44 regulates cell migration in human colon cancer cells via Lyn kinase and AKT phosphorylation*. Exp Mol Pathol, 2007. **83**(2): p. 207-15.
29. Gansauge, F., et al., *Differential expression of CD44 splice variants in human pancreatic adenocarcinoma and in normal pancreas*. Cancer Res, 1995. **55**(23): p. 5499-503.
30. Gotoda, T., et al., *Expression of CD44 variants and its association with survival in pancreatic cancer*. Jpn J Cancer Res, 1998. **89**(10): p. 1033-40.
31. Evanko, S.P., W.T. Parks, and T.N. Wight, *Intracellular hyaluronan in arterial smooth muscle cells: association with microtubules, RHAMM, and the mitotic spindle*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(12): p. 1525-35.
32. Auvinen, P., et al., *Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival*. Am J Pathol, 2000. **156**(2): p. 529-36.
33. Auvinen, P., et al., *Increased hyaluronan content and stromal cell CD44 associate with HER2 positivity and poor prognosis in human breast cancer*. Int J Cancer, 2013. **132**(3): p. 531-9.
34. Josefsson, A., et al., *Prostate cancer increases hyaluronan in surrounding nonmalignant stroma, and this response is associated with tumor growth and an unfavorable outcome*. Am J Pathol, 2011. **179**(4): p. 1961-8.
35. Anttila, M.A., et al., *High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(1): p. 150-5.
36. Pirinen, R., et al., *Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma*. Int J Cancer, 2001. **95**(1): p. 12-7.

37. Toole, B.P. and M.G. Slomiany, *Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance*. Drug Resist Updat, 2008. **11**(3): p. 110-21.
38. Tijink, B.M., et al., *A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(20 Pt 1): p. 6064-72.
39. Handorean, A.M., et al., *Silibinin suppresses CD44 expression in prostate cancer cells*. Am J Transl Res, 2009. **1**(1): p. 80-6.
40. So, J.Y., et al., *A novel Gemini vitamin D analog represses the expression of a stem cell marker CD44 in breast cancer*. Mol Pharmacol, 2011. **79**(3): p. 360-7.
41. Li, C.Z., et al., *Inhibition of CD44 expression by small interfering RNA to suppress the growth and metastasis of ovarian cancer cells in vitro and in vivo*. Folia Biol (Praha), 2008. **54**(6): p. 180-6.
42. Fuchs, K., et al., *Opposing effects of high- and low-molecular weight hyaluronan on CXCL12-induced CXCR4 signaling depend on CD44*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e819.
43. Journo-Gershfeld, G., et al., *Hyaluronan oligomers-HPMA copolymer conjugates for targeting paclitaxel to CD44-overexpressing ovarian carcinoma*. Pharm Res, 2012. **29**(4): p. 1121-33.
44. Thompson, C.B., et al., *Enzymatic depletion of tumor hyaluronan induces antitumor responses in preclinical animal models*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(11): p. 3052-64.
45. Kultti, A., et al., *4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3*. Exp Cell Res, 2009. **315**(11): p. 1914-23.
46. Nagy, N., et al., *4-methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 123.
47. Takeda, S. and M. Aburada, *The choleric mechanism of coumarin compounds and phenolic compounds*. J Pharmacobiodyn, 1981. **4**(9): p. 724-34.
48. Tanayama, S. and Y. Kanai, *Studies on increased bile formation produced by polyoxybenzenes in rats*. Jpn J Pharmacol, 1977. **27**(1): p. 71-8.
49. Kakizaki, I., et al., *A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33281-9.
50. Vigetti, D., et al., *Molecular cloning and characterization of UDP-glucose dehydrogenase from the amphibian Xenopus laevis and its involvement in hyaluronan synthesis*. J Biol Chem, 2006. **281**(12): p. 8254-63.
51. Pasonen-Seppanen, S., et al., *EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(6): p. 1038-44.
52. Karvinen, S., et al., *Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 49495-504.
53. Vigetti, D., et al., *The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells*. Glycobiology, 2009. **19**(5): p. 537-46.

54. Arai, E., et al., *Inhibition of hyaluronan retention by 4-methylumbelliferone suppresses osteosarcoma cells in vitro and lung metastasis in vivo*. Br J Cancer, 2011. **105**(12): p. 1839-49.
55. Urakawa, H., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo*. Int J Cancer, 2012. **130**(2): p. 454-66.
56. Ban, H., O. Uchakina, and R.J. McKallip, *Hyaluronic Acid Inhibitor 4-Methylumbelliferone Activates the Intrinsic Apoptosis Pathway in K562 Chronic Myelogenous Leukemia Cells*. Anticancer Res, 2015. **35**(10): p. 5231-40.
57. Uchakina, O.N., H. Ban, and R.J. McKallip, *Targeting hyaluronic acid production for the treatment of leukemia: treatment with 4-methylumbelliferone leads to induction of MAPK-mediated apoptosis in K562 leukemia*. Leuk Res, 2013. **37**(10): p. 1294-301.
58. Nakazawa, H., et al., *4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells*. Cancer Chemother Pharmacol, 2006. **57**(2): p. 165-70.
59. Krawzak, H.W., et al., *Postprandial bile-duct kinetics under the influence of 4-methylumbelliferone (hymecromone)*. Int J Clin Pharmacol Ther, 1995. **33**(10): p. 569-72.
60. Walter, P. and W. Seidel, *[Studies on the effect of 4-methyl-umbelliferon (Hymecromone) in patients following surgical revision of the biliary pathways]*. Chirurg, 1979. **50**(7): p. 436-40.
61. Lunt, S.Y. and M.G. Vander Heiden, *Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 441-64.
62. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
63. Berg, J.M., et al., *Stryer Biochemie*. 2017: Springer Berlin Heidelberg.
64. Pfeiffer, T., S. Schuster, and S. Bonhoeffer, *Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways*. Science, 2001. **292**(5516): p. 504-7.
65. Vander Heiden, M.G., et al., *Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells*. Science, 2010. **329**(5998): p. 1492-9.
66. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. 2007: Garland Science.
67. Zhang, Q., D.W. Piston, and R.H. Goodman, *Regulation of corepressor function by nuclear NADH*. Science, 2002. **295**(5561): p. 1895-7.
68. Wike-Hooley, J.L., J. Haveman, and H.S. Reinhold, *The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease*. Radiother Oncol, 1984. **2**(4): p. 343-66.
69. Gottfried, E., et al., *Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2013-21.
70. Koukourakis, M.I., et al., *Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 632-7.
71. Solaini, G., et al., *Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 1171-7.
72. O'Rourke, J.F., et al., *Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1*. Eur J Biochem, 1996. **241**(2): p. 403-10.

73. Norrelund, H., et al., *The effect of growth hormone on the insulin-like growth factor system during fasting*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(7): p. 3292-8.
74. Zhou, G., et al., *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. J Clin Invest, 2001. **108**(8): p. 1167-74.
75. Domingo, E., et al., *Evaluation of PIK3CA mutation as a predictor of benefit from nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy in colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2013. **31**(34): p. 4297-305.
76. Colman, R.J., et al., *Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys*. Science, 2009. **325**(5937): p. 201-4.
77. Longo, V.D. and L. Fontana, *Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(2): p. 89-98.
78. Vernieri, C., et al., *Targeting Cancer Metabolism: Dietary and Pharmacologic Interventions*. Cancer Discov, 2016. **6**(12): p. 1315-1333.
79. Zhang, Z.J., et al., *Reduced risk of lung cancer with metformin therapy in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis*. Am J Epidemiol, 2014. **180**(1): p. 11-4.
80. Bodmer, M., et al., *Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer*. Diabetes Care, 2010. **33**(6): p. 1304-8.
81. Kordes, S., et al., *Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(7): p. 839-47.
82. Reni, M., et al., *(Ir)relevance of Metformin Treatment in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer: An Open-Label, Randomized Phase II Trial*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(5): p. 1076-85.
83. Hawley, S.A., et al., *The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase*. Science, 2012. **336**(6083): p. 918-22.
84. Rothwell, P.M., et al., *Short-term effects of daily aspirin on cancer incidence, mortality, and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials*. Lancet, 2012. **379**(9826): p. 1602-12.
85. Rothwell, P.M., et al., *Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials*. Lancet, 2011. **377**(9759): p. 31-41.
86. Pritchard, R., et al., *Celecoxib inhibits mitochondrial O2 consumption, promoting ROS dependent death of murine and human metastatic cancer cells via the apoptotic signalling pathway*. Biochem Pharmacol, 2018. **154**: p. 318-334.
87. Sung, M.W., et al., *Celecoxib enhances the inhibitory effect of 5-FU on human squamous cell carcinoma proliferation by ROS production*. Laryngoscope, 2017. **127**(4): p. E117-E123.
88. Baggstrom, M.Q., et al., *A phase II study of AT-101 (Gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(10): p. 1757-60.
89. Ready, N., et al., *Double-blind, placebo-controlled, randomized phase 2 study of the proapoptotic agent AT-101 plus docetaxel, in second-line non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(4): p. 781-5.
90. Pinheiro, C., et al., *Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma*. Histopathology, 2010. **56**(7): p. 860-7.

91. Pinheiro, C., et al., *Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas*. Virchows Arch, 2008. **452**(2): p. 139-46.
92. Berendzen, K., et al., *Therapeutic potential of dichloroacetate for pyruvate dehydrogenase complex deficiency*. Mitochondrion, 2006. **6**(3): p. 126-35.
93. Whitehouse, S. and P.J. Randle, *Activation of pyruvate dehydrogenase in perfused rat heart by dichloroacetate (Short Communication)*. Biochem J, 1973. **134**(2): p. 651-3.
94. Knoechel, T.R., et al., *Regulatory roles of the N-terminal domain based on crystal structures of human pyruvate dehydrogenase kinase 2 containing physiological and synthetic ligands*. Biochemistry, 2006. **45**(2): p. 402-15.
95. Bowker-Kinley, M.M., et al., *Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex*. Biochem J, 1998. **329** (Pt 1): p. 191-6.
96. Bonnet, S., et al., *A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth*. Cancer Cell, 2007. **11**(1): p. 37-51.
97. Stacpoole, P.W., et al., *Treatment of congenital lactic acidosis with dichloroacetate*. Arch Dis Child, 1997. **77**(6): p. 535-41.
98. Bersin, R.M. and P.W. Stacpoole, *Dichloroacetate as metabolic therapy for myocardial ischemia and failure*. Am Heart J, 1997. **134**(5 Pt 1): p. 841-55.
99. Gibala, M.J. and B. Saltin, *PDH activation by dichloroacetate reduces TCA cycle intermediates at rest but not during exercise in humans*. Am J Physiol, 1999. **277**(1): p. E33-8.
100. Curry, S.H., et al., *Plasma concentrations and metabolic effects of intravenous sodium dichloroacetate*. Clin Pharmacol Ther, 1985. **37**(1): p. 89-93.
101. Morten, K.J., M. Caky, and P.M. Matthews, *Stabilization of the pyruvate dehydrogenase E1alpha subunit by dichloroacetate*. Neurology, 1998. **51**(5): p. 1331-5.
102. Han, Z., et al., *A combined therapeutic approach for pyruvate dehydrogenase deficiency using self-complementary adeno-associated virus serotype-specific vectors and dichloroacetate*. Mol Genet Metab, 2008. **93**(4): p. 381-7.
103. Stacpoole, P.W., G.W. Moore, and D.M. Kornhauser, *Metabolic effects of dichloroacetate in patients with diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia*. N Engl J Med, 1978. **298**(10): p. 526-30.
104. Babu, E., et al., *Role of SLC5A8, a plasma membrane transporter and a tumor suppressor, in the antitumor activity of dichloroacetate*. Oncogene, 2011. **30**(38): p. 4026-37.
105. Sutendra, G., et al., *Mitochondrial activation by inhibition of PDKII suppresses HIF1a signaling and angiogenesis in cancer*. Oncogene, 2013. **32**(13): p. 1638-50.
106. Niewisch, M.R., et al., *Influence of dichloroacetate (DCA) on lactate production and oxygen consumption in neuroblastoma cells: is DCA a suitable drug for neuroblastoma therapy?* Cell Physiol Biochem, 2012. **29**(3-4): p. 373-80.
107. Stacpoole, P.W., et al., *Pharmacokinetics, metabolism and toxicology of dichloroacetate*. Drug Metab Rev, 1998. **30**(3): p. 499-539.
108. Stacpoole, P.W., *The pharmacology of dichloroacetate*. Metabolism, 1989. **38**(11): p. 1124-44.

109. Dunbar, E.M., et al., *Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors*. Invest New Drugs, 2014. **32**(3): p. 452-64.
110. Garon, E.B., et al., *Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2014. **140**(3): p. 443-52.
111. Michelakis, E.D., et al., *Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate*. Sci Transl Med, 2010. **2**(31): p. 31ra34.
112. Chu, Q.S., et al., *A phase I open-labeled, single-arm, dose-escalation, study of dichloroacetate (DCA) in patients with advanced solid tumors*. Invest New Drugs, 2015. **33**(3): p. 603-10.
113. Kaufmann, P., et al., *Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial*. Neurology, 2006. **66**(3): p. 324-30.
114. Sun, R.C., P.G. Board, and A.C. Blackburn, *Targeting metabolism with arsenic trioxide and dichloroacetate in breast cancer cells*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 142.
115. Zhou, X., et al., *Dichloroacetate restores drug sensitivity in paclitaxel-resistant cells by inducing citric acid accumulation*. Mol Cancer, 2015. **14**: p. 63.
116. Shroads, A.L., et al., *Age-dependent kinetics and metabolism of dichloroacetate: possible relevance to toxicity*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **324**(3): p. 1163-71.
117. Stacpoole, P.W., et al., *Dichloroacetate-induced peripheral neuropathy*. Int Rev Neurobiol, 2019. **145**: p. 211-238.
118. Donofrio, P.D., *Textbook of Peripheral Neuropathy*. 2012: Springer Publishing Company.
119. Smyth, E.C., et al., *Oesophageal cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17048.
120. Pennathur, A., et al., *Oesophageal carcinoma*. Lancet, 2013. **381**(9864): p. 400-12.
121. Li, X., et al., *Parallel Accumulation of tumor hyaluronan, collagen, and other drivers of tumor progression*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(19): p. 4798-4807.
122. Amorim, S., et al., *Molecular weight of surface immobilized hyaluronic acid influences CD44-mediated binding of gastric cancer cells*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 16058.
123. Wang, C., et al., *Hyaluronan distribution in the normal epithelium of esophagus, stomach, and colon and their cancers*. Am J Pathol, 1996. **148**(6): p. 1861-9.
124. Twarock, S., et al., *Inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma progression by in vivo targeting of hyaluronan synthesis*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 30.
125. Michelakis, E.D., L. Webster, and J.R. Mackey, *Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer*. Br J Cancer, 2008. **99**(7): p. 989-94.
126. Liu, Y., et al., *A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(8): p. 1672-82.
127. Liu, Z., et al., *Proteomic identification of differentially-expressed proteins in esophageal cancer in three ethnic groups in Xinjiang*. Mol Biol Rep, 2011. **38**(5): p. 3261-9.
128. Zhang, X., et al., *Nuclear PKM2 expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma*. Pathol Res Pract, 2013. **209**(8): p. 510-5.

129. Polee, M.B., et al., *Prognostic factors for survival in patients with advanced oesophageal cancer treated with cisplatin-based combination chemotherapy*. Br J Cancer, 2003. **89**(11): p. 2045-50.
130. Griffith, L.G. and M.A. Swartz, *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(3): p. 211-24.
131. Birgersdotter, A., R. Sandberg, and I. Ernberg, *Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(5): p. 405-12.
132. Chambers, K.F., et al., *3D Cultures of prostate cancer cells cultured in a novel high-throughput culture platform are more resistant to chemotherapeutics compared to cells cultured in monolayer*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111029.
133. Santini, M.T., et al., *MG-63 human osteosarcoma cells grown in monolayer and as three-dimensional tumor spheroids present a different metabolic profile: a (1)H NMR study*. FEBS Lett, 2004. **557**(1-3): p. 148-54.
134. Longaker, M.T., et al., *Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid*. Ann Surg, 1991. **213**(4): p. 292-6.
135. Stern, R., et al., *Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited*. Exp Cell Res, 2002. **276**(1): p. 24-31.
136. Tamada, M., et al., *Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells*. Cancer Res, 2012. **72**(6): p. 1438-48.
137. Moretto, P., et al., *Regulation of hyaluronan synthesis in vascular diseases and diabetes*. J Diabetes Res, 2015. **2015**: p. 167283.
138. Tammi, R.H., et al., *Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis*. FEBS J, 2011. **278**(9): p. 1419-28.
139. Twarock, S., et al., *Hyperglycaemia and aberrated insulin signalling stimulate tumour progression via induction of the extracellular matrix component hyaluronan*. Int J Cancer, 2017. **141**(4): p. 791-804.
140. Jokela, T.A., et al., *Mannose inhibits hyaluronan synthesis by down-regulation of the cellular pool of UDP-N-acetylhexosamines*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7666-73.
141. Hatzivassiliou, G., et al., *ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth*. Cancer Cell, 2005. **8**(4): p. 311-21.
142. Barnes, J., et al., *Isolation and analysis of sugar nucleotides using solid phase extraction and fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis*. MethodsX, 2016. **3**: p. 251-60.
143. Sirenko, O., et al., *High-content assays for characterizing the viability and morphology of 3D cancer spheroid cultures*. Assay Drug Dev Technol, 2015. **13**(7): p. 402-14.
144. Friedrich, J., et al., *A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay*. J Biomol Screen, 2007. **12**(7): p. 925-37.
145. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
146. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

147. Shurubor, Y.I., et al., *Simultaneous determination of tricarboxylic acid cycle metabolites by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. Anal Biochem, 2016. **503**: p. 8-10.
148. Rogers, G.W., S.E. Burroughs, and B.P. Dranka, *Direct measurements of cellular metabolism for identification of mitochondrial drug targets*, U. Agilent Technologies, Editor. 2018: USA.
149. Yoonseok Kam, N.R., Pam Swain and Brian P. Dranka, *Characterization of fuel dependencies in multidrug resistant breast cancer cells*, in *American Association of Cancer Researchers Annual Meeting*, A.T. Cell Analysis Division, Lexington, MA. , Editor. 2017. p. <https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/AACR%202017%20POSTER.pdf>.
150. Chou, T.C., *Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 621-81.
151. N., T.-C.C.M., *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values*. ComboSyn Inc, 2005.
152. Enzinger, P.C. and R.J. Mayer, *Esophageal cancer*. N Engl J Med, 2003. **349**(23): p. 2241-52.
153. Lin, E.W., et al., *The tumor microenvironment in esophageal cancer*. Oncogene, 2016. **35**(41): p. 5337-5349.
154. Twarock, S., et al., *Hyaluronan matrix inhibition enhances metabolic anticancer therapy by dichloroacetate in vitro and in vivo*. Br J Pharmacol, 2019.
155. Misra, S., et al., *Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 201.
156. Sullivan, S.G. and A. Stern, *Effects of physiologic concentrations of lactate, pyruvate and ascorbate on glucose metabolism in unstressed and oxidatively stressed human red blood cells*. Biochem Pharmacol, 1983. **32**(19): p. 2891-902.
157. Gnaiger, E., *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*, in *An Introduction to OXPHOS Analysis*, O.I. GmbH, Editor. 2012, Steiger Druck GmbH, Axams, Austria: Innsbruck, Austria. p. 65.
158. Walenta, S. and W.F. Mueller-Klieser, *Lactate: mirror and motor of tumor malignancy*. Semin Radiat Oncol, 2004. **14**(3): p. 267-74.
159. Butkinaree, C., K. Park, and G.W. Hart, *O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1800**(2): p. 96-106.
160. Vigetti, D., et al., *Metabolic control of hyaluronan synthases*. Matrix Biol, 2014. **35**: p. 8-13.
161. Chanmee, T., P. Ontong, and N. Itano, *Hyaluronan: A modulator of the tumor microenvironment*. Cancer Lett, 2016. **375**(1): p. 20-30.
162. Tammi, M.I., et al., *Activated hyaluronan metabolism in the tumor matrix - Causes and consequences*. Matrix Biol, 2019. **78-79**: p. 147-164.
163. Chae, H.J., et al., *Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts*. Pharmacol Res, 2000. **42**(4): p. 373-81.
164. Papandreou, I., T. Goliassova, and N.C. Denko, *Anticancer drugs that target metabolism: Is dichloroacetate the new paradigm?* Int J Cancer, 2011. **128**(5): p. 1001-8.

165. Martinez-Outschoorn, U.E., et al., *Cancer metabolism: a therapeutic perspective*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(2): p. 113.
166. Stockwin, L.H., et al., *Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC*. Int J Cancer, 2010. **127**(11): p. 2510-9.
167. Vincent, T., et al., *Hyaluronan, a major non-protein glycosaminoglycan component of the extracellular matrix in human bone marrow, mediates dexamethasone resistance in multiple myeloma*. Br J Haematol, 2003. **121**(2): p. 259-69.
168. Wang, S.J. and L.Y. Bourguignon, *Hyaluronan and the interaction between CD44 and epidermal growth factor receptor in oncogenic signaling and chemotherapy resistance in head and neck cancer*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2006. **132**(7): p. 771-8.
169. Cordo Russo, R.I., et al., *Hyaluronan oligosaccharides sensitize lymphoma resistant cell lines to vincristine by modulating P-glycoprotein activity and PI3K/Akt pathway*. Int J Cancer, 2008. **122**(5): p. 1012-8.
170. Bourguignon, L.Y., W. Xia, and G. Wong, *Hyaluronan-mediated CD44 interaction with p300 and SIRT1 regulates beta-catenin signaling and NFkappaB-specific transcription activity leading to MDR1 and Bcl-xL gene expression and chemoresistance in breast tumor cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2657-71.
171. Ricciardelli, C., et al., *Chemotherapy-induced hyaluronan production: a novel chemoresistance mechanism in ovarian cancer*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 476.
172. Evanko, S.P., et al., *Hyaluronan-dependent pericellular matrix*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(13): p. 1351-65.
173. Clark, A.S., et al., *Dichloroacetate inhibits glycolysis and augments insulin-stimulated glycogen synthesis in rat muscle*. J Clin Invest, 1987. **79**(2): p. 588-94.
174. Oikari, S., et al., *UDP-sugar accumulation drives hyaluronan synthesis in breast cancer*. Matrix Biol, 2018. **67**: p. 63-74.
175. Vigetti, D., et al., *Role of UDP-N-acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of hyaluronan synthase 2 in the control of chondroitin sulfate and hyaluronan synthesis*. J Biol Chem, 2012. **287**(42): p. 35544-55.
176. Pietrocola, F., et al., *Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger*. Cell Metab, 2015. **21**(6): p. 805-21.
177. Zaidi, N., J.V. Swinnen, and K. Smans, *ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism*. Cancer Res, 2012. **72**(15): p. 3709-14.
178. Brownsey, R.W., et al., *Regulation of acetyl-CoA carboxylase*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 2): p. 223-7.
179. Migita, T., et al., *ATP citrate lyase: activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(20): p. 8547-54.
180. Brockhausen, I., et al., *Human acetyl-CoA:glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase 1 has a relaxed donor specificity and transfers acyl groups up to four carbons in length*. Biochem Cell Biol, 2016. **94**(2): p. 197-204.
181. Hart, G.W. and Y. Akimoto, *The O-GlcNAc Modification*, in *Essentials of Glycobiology*, nd, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY).
182. Hanover, J.A., M.W. Krause, and D.C. Love, *Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(5): p. 312-21.

183. Yi, W., et al., *Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism*. Science, 2012. **337**(6097): p. 975-80.
184. Ferrer, C.M., et al., *O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway*. Mol Cell, 2014. **54**(5): p. 820-31.
185. Yang, W.H., et al., *Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(10): p. 1074-83.
186. Dias, W.B., et al., *Regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV by O-GlcNAc modification*. J Biol Chem, 2009. **284**(32): p. 21327-37.
187. Zhu, Y., et al., *Post-translational O-GlcNAcylation is essential for nuclear pore integrity and maintenance of the pore selectivity filter*. J Mol Cell Biol, 2016. **8**(1): p. 2-16.
188. Tiainen, S., et al., *High extent of O-GlcNAcylation in breast cancer cells correlates with the levels of HAS enzymes, accumulation of hyaluronan, and poor outcome*. Breast Cancer Res Treat, 2016. **160**(2): p. 237-247.
189. Deen, A.J., et al., *UDP-sugar substrates of HAS3 regulate its O-GlcNAcylation, intracellular traffic, extracellular shedding and correlate with melanoma progression*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(16): p. 3183-204.
190. Hart, G.W., *Nutrient regulation of signaling and transcription*. J Biol Chem, 2019. **294**(7): p. 2211-2231.
191. Akimoto, Y., et al., *Hyperglycemia and the O-GlcNAc transferase in rat aortic smooth muscle cells: elevated expression and altered patterns of O-GlcNAcylation*. Arch Biochem Biophys, 2001. **389**(2): p. 166-75.
192. Walgren, J.L., et al., *High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(2): p. E424-34.
193. Piccioni, F., et al., *4-methylumbelliferone inhibits hepatocellular carcinoma growth by decreasing IL-6 production and angiogenesis*. Glycobiology, 2015. **25**(8): p. 825-35.
194. Morera, D.S., et al., *Hyaluronic acid family in bladder cancer: potential prognostic biomarkers and therapeutic targets*. Br J Cancer, 2017. **117**(10): p. 1507-1517.
195. Lokeshwar, V.B., et al., *Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells*. Cancer Res, 2010. **70**(7): p. 2613-23.
196. Abate, A., et al., *Hymecromone in the treatment of motor disorders of the bile ducts: a multicenter, double-blind, placebo-controlled clinical study*. Drugs Exp Clin Res, 2001. **27**(5-6): p. 223-31.
197. Hoffmann, R.M., et al., *[Bile acid-independent effect of hymecromone on bile secretion and common bile duct motility]*. Dtsch Med Wochenschr, 2005. **130**(34-35): p. 1938-43.
198. Yoshida, E., et al., *4-Methylumbelliferone decreases the hyaluronan-rich extracellular matrix and increases the effectiveness of 5-Fluorouracil*. Anticancer Res, 2018. **38**(10): p. 5799-5804.
199. Cho, H., et al., *Trametinib plus 4-Methylumbelliferone exhibits antitumor effects by ERK blockade and CD44 downregulation and affects PD-1 and PD-L1 in malignant pleural mesothelioma*. J Thorac Oncol, 2017. **12**(3): p. 477-490.
200. Uchakina, O.N., et al., *Inhibition of hyaluronic acid formation sensitizes chronic myelogenous leukemia to treatment with doxorubicin*. Glycobiology, 2016. **26**(11): p. 1171-1179.

201. Kaufmann, M., et al., *CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival*. Lancet, 1995. **345**(8950): p. 615-9.
202. Mele, V., et al., *The hyaluronan-mediated motility receptor RHAMM promotes growth, invasiveness and dissemination of colorectal cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(41): p. 70617-70629.
203. Carter, W.H., Jr., et al., *Drug activity and therapeutic synergism in cancer treatment*. Cancer Res, 1982. **42**(8): p. 2963-71.
204. Mohan, A., et al., *Novel resveratrol and 5-fluorouracil coencapsulated in PEGylated nanoliposomes improve chemotherapeutic efficacy of combination against head and neck squamous cell carcinoma*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 424239.
205. Skeberdyte, A., et al., *Dichloroacetate and salinomycin exert a synergistic cytotoxic effect in Colorectal Cancer Cell Lines*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 17744.
206. Olszewski, U., et al., *In vitro cytotoxicity of combinations of dichloroacetate with anticancer platinum compounds*. Clin Pharmacol, 2010. **2**: p. 177-83.
207. Florio, R., et al., *Effects of dichloroacetate as single agent or in combination with GW6471 and metformin in paraganglioma cells*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 13610.
208. Pampaloni, F., E.G. Reynaud, and E.H. Stelzer, *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 839-45.
209. Baker, B.M. and C.S. Chen, *Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 13): p. 3015-24.
210. Lee, J., M.J. Cuddihy, and N.A. Kotov, *Three-dimensional cell culture matrices: state of the art*. Tissue Eng Part B Rev, 2008. **14**(1): p. 61-86.
211. Riffle, S. and R.S. Hegde, *Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids*. J Exp Clin Cancer Res, 2017. **36**(1): p. 102.
212. Dai, Y., et al., *Dichloroacetate enhances adriamycin-induced hepatoma cell toxicity in vitro and in vivo by increasing reactive oxygen species levels*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e92962.
213. Voltan, R., et al., *Metformin combined with sodium dichloroacetate promotes B leukemic cell death by suppressing anti-apoptotic protein Mcl-1*. Oncotarget, 2016. **7**(14): p. 18965-77.
214. Abildgaard, C., et al., *Bioenergetic modulation with dichloroacetate reduces the growth of melanoma cells and potentiates their response to BRAFV600E inhibition*. J Transl Med, 2014. **12**: p. 247.
215. Zheng, M.F., S.Y. Shen, and W.D. Huang, *DCA increases the antitumor effects of capecitabine in a mouse B16 melanoma allograft and a human non-small cell lung cancer A549 xenograft*. Cancer Chemother Pharmacol, 2013. **72**(5): p. 1031-41.
216. Tataranni, T., et al., *Dichloroacetate Affects Mitochondrial Function and Stemness-Associated Properties in Pancreatic Cancer Cell Lines*. Cells, 2019. **8**(5).
217. Yoshihara, S., et al., *A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells*. FEBS Lett, 2005. **579**(12): p. 2722-6.
218. Nakamura, T., et al., *Hyaluronic-acid-deficient extracellular matrix induced by addition of 4-methylumbelliferone to the medium of cultured human skin fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **208**(2): p. 470-5.

219. McCall, C.E., et al., *Pyruvate dehydrogenase complex stimulation promotes immunometabolic homeostasis and sepsis survival*. JCI Insight, 2018. **3**(15).
220. James, M.O., et al., *Therapeutic applications of dichloroacetate and the role of glutathione transferase zeta-1*. Pharmacol Ther, 2017. **170**: p. 166-180.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

„Hyaluronan matrix inhibition enhances metabolic anticancer therapy by dichloroacetate *in vitro* and *in vivo*.” Twarock S*, **Reichert C***, Bach K, Reiners O, Kretschmer I, Gorski DJ, Gorges K, Grandoch M, Fischer JW. Br J Pharmacol. 2019 Jul 27. doi: 10.1111/bph.14808 (*geteilte Erstautorenschaft)

Der Eigenanteil an dieser Publikation beträgt: Figure 1; 2; 4A, C, D; 5; S1-S8; Durchführung und Analyse der Experimente und Auswertung der Ergebnisse. Zusätzlich wurde der Materialien und Methoden Teil verfasst.

„Cardiac fibroblast activation and hyaluronan synthesis in response to hyperglycemia and diet-induced insulin resistance.” Gorski DJ, Petz A, **Reichert C**, Twarock S, Grandoch M, Fischer JW. Sci Rep. 2019 Feb 12;9(1):1827. doi: 10.1038/s41598-018-36140-6.

Der Eigenanteil an dieser Publikation beträgt: Figure 4C, D; Durchführung und Analyse der Experimente und Auswertung der Ergebnisse.

„Hyperglycaemia and aberrated insulin signalling stimulate tumour progression via induction of the extracellular matrix component hyaluronan.” Twarock S, **Reichert C**, Peters U, Gorski DJ, Röck K, Fischer JW. Int J Cancer. 2017 Aug 15;141(4):791-804. doi: 10.1002/ijc.30776.

Der Eigenanteil an dieser Publikation beträgt: Figure 2A,B, E-G; 3, 4A-F; Durchführung und Analyse der Experimente und Auswertung der Ergebnisse.

Kongressbeiträge

Poster: *Hyaluronan matrix inhibition enhances metabolic anticancer therapy by dichloroacetate in vitro and in vivo* **C. Reichert**, S. Twarock, O. Reiners, K. Bach, M. Grandoch, J. W. Fischer; 8th Annual Congress of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2019, Stuttgart

Poster: *The combination of dichloroacetate and a hyaluronan synthesis inhibitors synergistically induces apoptosis in esophageal squamous carcinoma cells* **C.**

Reichert, S. Twarock, O. Reiners, J. W. Fischer 84th Annual Congress of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2018, Göttingen

Presentation: *Fibroblasts mediate tumor cell death through tunneling nanotubes in response to ionizing radiation* O. Reiners, A. Schütze, J. Morawitz, **C. Reichert**, D. Waldera-Lupa, V. Jendrossek, K. Stühler, K. Pantel, S. Twarock J. W. Fischer, K. Röck; 84th Annual Congress of the German Society for Experimental and Clinical

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den 26.Juli 2020

Christina Reichert