

Aus dem
Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

**Der metabolische Einfluss von Fettsäuren auf den
Hyaluronsäurestoffwechsel und die Progression von
ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen *in vitro* und
*in vivo***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Isabel Syben

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein

Einige Leute träumen von herausragenden Leistungen, während andere wach sind und sie vollbringen.

proSport Verlag

Zusammenfassung

Das Ösophaguskarzinom steht an der sechsten Stelle der Krebstodesstatistik, ist für einen von 18 Krebstodesfällen verantwortlich und weist eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 10 % auf. Es sind neue Therapieansätze notwendig, um die Lebenserwartung der Patienten und Patientinnen zu verbessern. Der Metabolismus von Tumorzellen stellt eine vielversprechende neue Zielstruktur tumorsuppressiver Therapie dar. Ebenso ist die Hyaluronsäure-Matrix ein wichtiger Faktor in der Tumorentstehung. Der Effekt der Metabolisierung von Fettsäuren auf die Tumorprogression ist unzureichend untersucht. Insbesondere wurde der Zusammenhang zwischen dem Fettsäuremetabolismus und der Hyaluronsäure-Synthese bisher nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, den Einfluss von Fettsäuren auf die Tumorprogression im Xenograft-Nacktmausmodell und auf die Hyaluronsäure-Synthese in ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen (KYSE) und in Stromazellen (NHDF) zu quantifizieren.

In vitro konnte mit der BODIPY-Färbung gezeigt werden, dass KYSE nach Behandlung mit Fettsäuren im Vergleich zu NHDF eine signifikant vermehrte intrazelluläre Fettsäuremenge aufwies. Überraschenderweise konnte mittels Affinitätsfärbung und einem ELISA-ähnlichen Versuchsansatz eine signifikant gesteigerte Synthese des Kohlenhydrats Hyaluronsäure der KYSE-Zellen unter Stimulation mit Fettsäuren gemessen werden. Zur Validierung dieser Ergebnisse *in vivo* wurde ein Nacktmausmodell mit Xenograft-Tumoren etabliert. Die Kontrollgruppe erhielt eine ausgewogene Ernährung, die Fettgruppe eine fettreiche Diät und die Kohlenhydratgruppe eine kohlenhydratreiche Diät. Nach 42 Tagen waren die Tumore der Kontrollgruppe am größten, gefolgt von den Tumoren der Fettgruppe; die kleinsten Tumore wurden in der Kohlenhydratgruppe beobachtet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Verzicht auf Fette oder Kohlenhydrate das Tumorwachstum senken könnte. Interessanterweise führt eine kohlenhydratreiche Diät also nicht zum maximalen Tumorprogress, wie es die Warburghypothese vermuten ließe. Analog zu den *In-vitro*-Versuchen zeigte sich im Tumorzellgewebe ein stärkeres BODIPY-Signal in der Fettgruppe verglichen mit dem Stroma. In Übereinstimmung mit den *In-vitro*-Versuchen wurde Hyaluronsäure signifikant stärker vom Tumorzellgewebe der Fettgruppe gebildet, wohingegen der Hyaluronsäurerezeptor CD44 im Tumorzellgewebe der Kontrollgruppe vermehrt exprimiert wurde. Diese Versuche zeigen, dass ein erhöhtes Fettsäureangebot zu einem erhöhten Hyaluronsäuregehalt in Tumorzellen führt. Es sind weitere Experimente erforderlich, um die entsprechenden Mechanismen aufzudecken.

Summary

Esophageal cancer is the sixth most common cancer-related death, accounts for one in 18 cancer deaths and has a poor prognosis with a five-year survival rate of less than 30 %. New treatment options are necessary to improve the life expectancy of patients. The metabolism of tumor cells represents a promising new target structure for tumor suppressive therapy. The hyaluronan matrix is also an important factor in tumor development. The effect of fatty acid metabolism on tumor progression is not sufficiently understood. So far, no correlation between fatty acid metabolism and hyaluronan synthesis has described.

The aim of this work is therefore to quantify the influence of fatty acids on tumor progression in a xenograft nude mouse model and on hyaluronan synthesis in esophageal squamous cell carcinoma (KYSE) as well as in stromal cells (NHDF).

In vitro, BODIPY staining showed that treatment with fatty acids resulted in a significantly increased intracellular fatty acid amount in KYSE cells compared to NHDF. Surprisingly, affinity staining and an ELISA-like assay showed a significantly upregulated hyaluronan synthesis of KYSE under stimulation with fatty acids. To validate these results in vivo, a nude mouse model with xenograft tumors was established. The control group received a balanced diet, the fat group a high-fat diet and the carbohydrate group received a high-carbohydrate diet. After 42 days, the tumors of the control group were the largest, followed by the tumors of the fat group; the smallest tumors were observed in the carbohydrate group. These results suggest that a reduction in fats or carbohydrates has a diminishing effect on tumor growth. Interestingly, a carbohydrate-rich diet does not lead to the greatest tumor progression, as assumed by the Warburg hypothesis. In line with the in vitro experiments, a stronger BODIPY signal was found in the tumor cell tissue of the fat group compared to stroma. Hyaluronan was produced significantly more by the tumor cell tissue of the fat group, whereas the hyaluronic acid receptor CD44 was expressed more frequently in the tumor cell tissue of the control group. These experiments show that increased fatty acid supply leads to increase hyaluronic acid content in tumor cells. Further experiments are needed to uncover the relevant mechanisms.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das ösophageale Plattenepithelkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Klassifikation	1
1.1.3 Therapie und Prognose	2
1.2 Das Hyaluronsäuresystem	2
1.2.1 Hyaluronsäure als Bestandteil der Tumormikroumgebung und als unterstützender Faktor in der Tumorgenese	2
1.2.2 Aufbau und Funktionen der Hyaluronsäure und deren Fragmente	3
1.2.3 Hyaluronsäure-Metabolismus	4
1.2.4 Hyaluronsäure vermittelte Signalkaskaden	5
1.3 Die Rolle der Fettsäuren im Tumormetabolismus	6
1.3.1 Nomenklatur, Eigenschaften und Funktion der Fettsäuren	7
1.3.2 Fettsäuremetabolismus	9
1.3.3 Interaktion zwischen Hyaluronsäuresynthese und Tumorfettsäuremetabolismus	10
1.4 Ziele der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Arbeitsmittel	13
2.1.1 Substanzen	13
2.1.2 Geräte	13
2.1.3 Hersteller	13
2.2 Zellkultur	14
2.2.1 Zellkultivierung	14
2.2.2 Versuchsaufbau <i>in vitro</i>	14
2.2.3 Etablierung Minimalmedium	15
2.2.4 Etablierung Fettsäurelösung	15

2.3	Immunzytochemie.....	16
2.3.1	BODIPY-Färbung.....	16
2.3.2	Hyaluronsäure-Quantifizierung.....	16
2.4	<i>In-vivo</i> -Versuche.....	17
2.4.1	Xenograft Nacktmausmodell.....	17
2.4.2	Versuchsaufbau <i>in vivo</i>	18
2.5	Immunhistochemie.....	19
2.5.1	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.....	19
2.5.2	Immunhistochemische Färbungen.....	20
2.5.3	Auswertung mit ImageJ.....	21
2.6	Statistik.....	21
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Etablierungen.....	22
3.1.1	Etablierung Minimalmedium.....	22
3.1.2	Etablierung Fettsäurelösung.....	25
3.2	Einfluss eines Fettsäureangebotes auf dessen Aufnahme in Tumorzellen und Fibroblasten.....	27
3.3	Einfluss von Fettsäuren auf die Hyaluronsäure-Synthese <i>in vitro</i>	29
3.3.1	HABP-Immunaффinitäts-Assay.....	30
3.3.2	Hyaluronsäurebindeprotein-Färbung.....	30
3.4	Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf das Tumolvolumen <i>in vivo</i> im Nacktmaus Xenograft Modell.....	33
3.5	Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Fettaufnahme <i>in vivo</i>	36
3.6	Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Hyaluronsäure-Synthese <i>in vivo</i>	38
3.7	Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Expression von CD44 <i>in vivo</i>	40
4	Diskussion.....	42
4.1	Einfluss des etablierten Minimalmediums auf das Überleben der Tumorzellen.....	42
4.2	Einfluss der Fettsäurelösung auf die Tumorzellen.....	43
4.3	Einfluss der Nährstoffe auf die FS Aufnahme <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	44
4.3.1	Korrelation des Fettsäureangebotes mit der Fettsäureaufnahme <i>in vitro</i> in Tumorzellen und Fibroblasten.....	44
4.3.2	Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Fettsäureaufnahme <i>in vivo</i> im Xenograft Nacktmausmodell.....	46
4.4	Einfluss der Nährstoffe auf die Hyaluronsäure-Synthese <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	47

4.4.1	Einfluss von Fettsäuren auf die Hyaluronsäure-Synthese in Tumorzellen und Fibroblasten <i>in vitro</i>	47
4.4.2	Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Hyaluronsäure-Synthese <i>in vivo</i> im Xenograft Nacktmausmodell	47
4.5	Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf das Tumolvolumen im Xenograft Nacktmausmodell	52
4.6	Zusammenhang zwischen dem beobachteten Tumolvolumen und der Hyaluronsäure-Synthese	54
4.7	Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 <i>in vivo</i> im Xenograft Nacktmausmodell	55
4.8	Einschränkungen und Ausblick.....	57
5	Schlussfolgerung	58
6	Literaturverzeichnis.....	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsaufbau <i>in vitro</i>	14
Abbildung 2: Versuchsaufbau <i>in vivo</i>	19
Abbildung 3: Das Überleben von NHDF in Minimalmedium ohne Zusätze	22
Abbildung 4: Das Überleben von KYSE in Minimalmedium ohne Zusätze.....	23
Abbildung 5: Das Überleben von KYSE im Minimalmedium mit verschiedenen Zusätzen.....	24
Abbildung 6: Das Überleben von KYSE in Minimalmedium mit 50 mg/L Glukose. 25	
Abbildung 7: Zellvitalität der NHDF während der Etablierung der Fettsäurelösung	26
Abbildung 8: Zellvitalität der KYSE während der Etablierung der Fettsäurelösung	27
Abbildung 9: NHDF zeigten ein stärkeres Fettsäuresignal nach Stimulation mit Linolsäure.....	28
Abbildung 10: KYSE zeigten ein stärkeres Fettsäuresignal nach Stimulation mit verschiedenen Fettsäuren.....	29
Abbildung 11: Steigerung der Hyaluronsäure-Konzentration in Zellkulturüberständen von KYSE durch das Angebot von Fettsäuren	30
Abbildung 12: Keine signifikante Steigerung der perizellulären Hyaluronsäure- Signalintensität durch Fettsäure-Stimulation in den NHDF	31
Abbildung 13: Steigerung der perizellulären Hyaluronsäure-Farbintensität in KYSE unter Stimulation mit Fettsäuren	32
Abbildung 14: Homogene Gewichtsverteilung der Nacktmäuse zwischen den drei Versuchsgruppen	33
Abbildung 15: Signifikant verschiedenes Tumolvolumen zwischen den drei Versuchsgruppen über den Versuchszeitraum	35
Abbildung 16: Gesteigerte Fettsäure-Signalintensität sowohl im Tumorgewebe als auch im Stroma unter einer fettreichen Diät.....	37
Abbildung 17: Stärkere Hyaluronsäure-Signalintensität im Tumorgewebe als im Stroma.....	38
Abbildung 18: Gesteigerte Hyaluronsäure-Signalintensität in den Tumoren der Fettgruppe	39
Abbildung 19: Gesteigerte Signalintensität des Hyaluronsäurerezeptors CD44 in der Kontrollgruppe.....	41
Abbildung 20: Glyoxylatzyklus bei Pflanzen: Generation eines C4-Kohlenhydrates aus zwei Acetyl-CoA	49
Abbildung 21: Schematisches Modell der metabolischen Interaktion von β - Oxidation, Citratzyklus und Hyaluronsäure-Synthese	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der verwendeten Fettsäuren	9
Tabelle 2: Geräte	13
Tabelle 3: Herstellerverzeichnis.....	13
Tabelle 4: Futterzusammensetzung.....	18
Tabelle 5: Primärantikörper für die Immunhistologie	20
Tabelle 6: Sekundärantikörper für die Immunhistologie.....	20
Tabelle 7: Fluoreszenzfarbstoffe für die Immunhistologie	20

Abkürzungsverzeichnis

β-Ox	Beta-Oxidation
AC	Aconitase
BSA	Bovines Serumalbumin
CHO	Kohlenhydratgruppe
CL	ATP-Citratlyase
CoA	Coenzym A
CS	Citratshuttle
CSy	Citratsynthase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FETT	Fettgruppe
Fruktose-6-P	Fruktose-6-Phosphat
FS	Fettsäure
FSL	Fettsäurelösung
GFAT	Glutamin:Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferase
GlcA	Glukuronsäure
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
Glukosamin-6-P	Glukosamin-6-Phosphat
Glukose-6-P	Glukose-6-Phosphat
Glukuronat-1-P	Glukuronat-1-Phosphat
GLUT	Glukose-Transporter
GNAT	Acetyl-CoA:Glukosamin-N-Acetyltransferase
HA	Hyaluronsäure
HABP	Hyaluronsäure-bindendes Protein
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
ICL	Isocitratlyase
KON	Kontrollgruppe
KYSE	Ösophagusplattenepithelkarzinomzelllinie KYSE-410
Linol	Linolsäure
MD	Malatdehydrogenase
MM	Minimalmedium
MPT	Mitochondrialer Pyruvat-Transporter
MS	Malatsynthase
MW	Mittelwert
N-Acetyl-Glukosamin-6-P	N-Acetyl-Glukosamin-6-Phosphat
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten
OGT	O-N-Acetyl-Glukosamintransferase
ÖI	Ölsäure
Palm	Palmitinsäure
PDK	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute-Medium</i>

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TCA	Citratzyklus
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
TMU	Tumormikroumgebung
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen; Tumor-Klassifikation
TV	Tumorvolumen

1 Einleitung

1.1 Das ösophageale Plattenepithelkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Ösophaguskarzinom steht weltweit an der siebten Stelle der Krebsinzidenzen mit 604.000 Neuerkrankung im Jahr 2020. Mit 544.000 Todesfällen im Jahr 2020 ist das Ösophaguskarzinom die sechsthäufigste krebsbedingte Todesursache und für einen von 18 Krebstodesfällen verantwortlich. Vergleicht man zwischen den Geschlechtern, so treten 70 % der Fälle bei Männern auf. Die Inzidenz und Mortalitätsraten unterscheiden sich zwischen den Geschlechtern um das zwei- bis dreifache. Die höchsten regionalen Inzidenzraten sind bei Männern und Frauen in Ostasien zu finden (1).

Das Ösophaguskarzinom kann in zwei Subtypen unterteilt werden, in das ösophageale Plattenepithelkarzinom, welches als Zelllinie in dieser Dissertation verwendet wurde, und in das ösophageale Adenokarzinom. Die Inzidenz des Plattenepithelkarzinomes der Speiseröhre ist rückläufig. Nachdem es im Jahr 2012 mit 87 % (2) noch der dominierende Subtyp gewesen ist, gab es in den letzten Jahren eine epidemiologische Veränderung der Inzidenzrate des Ösophaguskarzinoms in der westlichen Bevölkerung, sodass das Adenokarzinom des Ösophagus zum vorherrschenden Subtyp in Nordamerika, Australien und Westeuropa wurde (3). Im Jahr 2020 macht das Adenokarzinom zwei Drittel aller Fälle in Ländern mit hohem Einkommen aus. Auch in weniger entwickelten Ländern ist die Inzidenz des Plattenepithelkarzinomes in Hochrisikogebieten rückläufig. Dies ist am ehesten auf wirtschaftliche Fortschritte und verbesserte Ernährungsbedingungen zurückzuführen (1). Zu den Risikofaktoren des ösophagealen Plattenepithelkarzinoms zählen vor allem der Alkoholkonsum und der Zigarettenrauch. Das Risiko für ein Plattenepithelkarzinom ist bei Rauchern drei- bis fünfmal höher als bei Personen, die nie geraucht haben (4). Um den gleichen Faktor erhöht ist das Risiko für die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinomes unter Alkoholkonsumenten, verglichen mit Personen, die niemals Alkohol getrunken haben (5). Es gibt außerdem starke Hinweise auf eine synergistische Wirkung von Zigarettenrauch und Alkoholkonsum auf das Risiko eines Plattenepithelkarzinoms der Speiseröhre (6).

1.1.2 Klassifikation

Die therapeutische Strategie basiert auf einer genauen Klassifikation. Das prätherapeutische Tumorstadium sollte anhand einer klinischen Untersuchung, einer Endoskopie inklusive Biopsieentnahme und einer Computertomografie von Thorax und Abdomen definiert werden. Wird eine Resektion des Tumors in Erwägung gezogen,

sollte zusätzlich ein endoskopischer Ultraschall und eine Positronen-Emissions-Tomographie durchgeführt werden, um die genaue Tumorausdehnung erfassen zu können (7). Das Stadium ist nach der TNM-Klassifikation *des American Joint Cancer Committee (AJCC) / Union for International Cancer Control (UICC)* mit entsprechender Stufeneinteilung anzugeben, welches die Infiltrationstiefe des Primärtumors (T), die Anzahl der betroffenen Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) berücksichtigt (8).

1.1.3 Therapie und Prognose

Patienten und Patientinnen mit der Diagnose eines ösophagealen Plattenepithelkarzinom leiden meist unter Dysphagie und Gewichtsverlust und haben häufig eine positive Alkohol- und Nikotinanamnese. Die Therapie steht unter einem individuellen multimodalen Konzept und ist abhängig von der Tumorlokalisation, der Histologie, der TNM-Klassifikation und dem klinischen Zustand der Patienten und Patientinnen. Meist erfolgt eine Kombination aus operativer Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie mit Platinderivaten, 5-Fluoruracil und Taxanen (7), (9). Das Ösophaguskarzinom ist jedoch stets gekennzeichnet durch eine schlechte Überlebensrate. Die Mortalität folgt eng ihrer Inzidenz, was bedeutet, dass die meisten Erkrankten auch an dieser Diagnose versterben (2). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 15 % und 25 %. Eine frühzeitige Diagnose in frühen Tumorstadien ist mit einer besseren Prognose assoziiert (9).

1.2 Das Hyaluronsäuresystem

1.2.1 Hyaluronsäure als Bestandteil der Tumormikroumgebung und als unterstützender Faktor in der Tumorgenese

Tumore werden durch eine eigene Art von Bindegewebsstroma, der Tumormikroumgebung (TMU), unterstützt, welche für den Tumorprogress eine entscheidende Rolle spielt. Die Zusammensetzung und Struktur der TMU ist von Tumor zu Tumor unterschiedlich und wird mit dem Tumorwachstum umgestaltet. Die TMU besteht nicht nur aus Endothelzellen, Fibroblasten und Entzündungszellen, sondern auch aus Wachstumsfaktoren und der extrazellulären Matrix. In der TMU stellt Hyaluronsäure (HA) durch den Aufbau von perizellulärer und extrazellulärer Matrix ein dreidimensionales Gerüst für Zellen bereit und reguliert das Verhalten von Stroma und Tumor, unter anderem über die Wechselwirkung mit Hyaluronsäurerezeptoren (10).

Betrachtet man das ösophageale Plattenepithelkarzinom, so ist HA in der TMU von besonderer Bedeutung (11). Es konnte mit der Hilfe von Färbungen gezeigt werden,

dass das Stroma in der TMU einen hohen HA Gehalt aufweist. Dieses HA-reiche Stroma scheint an der Invasion des Tumors beteiligt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass Tumore, welche die Muskelwand infiltrieren, ein HA reiches Stroma aufweisen. Der Ursprung der HA in der TMU ist nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass die Stromazellen durch die Tumorzellen zur Hyaluronsäuresynthese angeregt werden. Andererseits wird besonders bei Plattenepithelkarzinomen beschrieben, dass die Tumore selbst große Mengen HA synthetisieren. Ob diese HA dann in die TMU abgegeben wird, muss noch geklärt werden (12). Dies bedeutet, dass sowohl Tumorzellen als auch Stromazellen HA synthetisieren. Des Weiteren konnte beispielsweise unter anderem in Mammakarzinomen (13), Prostatakarzinomen (14), Ovarialkarzinomen (15) und in nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (16) eine Korrelation zwischen vermehrter Hyaluronsäureakkumulation und einer erhöhten Tumoraggressivität in Verbindung mit geringerem Überleben beobachtet werden. Ein hoher Hyaluronsäuregehalt ist mit Invasion (17), Lymphangiogenese (18), Angiogenese (19), epithelial-mesenchymaler Transition (20) und mit Metastasenbildung verbunden (21). Eine erhöhte Hyaluronsäureproduktion kann darüber hinaus eine erhöhte Chemotherapieresistenz und Apoptoseresistenz induzieren (22), während Hyaluronsäureantagonisten all diese Phänomene unterdrücken können (23). Des Weiteren kann HA einerseits als Wirkstoffträger zur Behandlung verschiedener Krebsarten eingesetzt werden (24), andererseits wird rekombinante Hyaluronidase beispielsweise in der Therapie des hyaluronsäurereichen Pankreaskarzinoms eingesetzt (25).

1.2.2 Aufbau und Funktionen der Hyaluronsäure und deren Fragmente

HA ist ein unverzweigtes Glykosaminoglykan, welches aus 2×10^3 bis 25×10^3 wiederholenden Disaccharid-Einheiten besteht. D-N-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc) und D-Glukuronsäure (GlcA) sind dabei alternierend über β -1,3- und β -1,4-glykosidische Bindungen verknüpft. Dieses Polysaccharid kann ein Molekulargewicht von bis zu 10^7 Da erreichen (26) und entsteht aus Vorstufen der Glykolyse (27).

HA kommt in allen Wirbeltieren vor und ist neben Kollagen Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Große HA Moleküle befinden sich extrazellulär, sind raumgreifend und haben regulatorische und strukturgebende Funktionen, wie beispielsweise im *Corpus vitreum* des Auges oder als Gleitmittel in der Synovia (28). Aufgrund der negativen Ladung bei neutralem pH-Wert besitzt HA wässrige Domänen, welche das Matrixmolekül umgibt (26). Eine entscheidende Rolle spielt dieses Glykosaminoglykan sowohl in der embryonalen Entwicklung von Organsystemen (29),

bei Gewebeentzündungen (30) als auch bei der Wundheilung (31). Betrachtet man die Funktion der HA in der Tumorentstehung, so unterstützt HA die maligne Tumorgenese durch Metastasierung, Neoangiogenese und Chemotherapieresistenz (26).

Allerdings zeigen mehrere Studien, dass die Zellfunktionen abhängig von der Fragmentgröße der HA gesteuert werden. Große Polymere spielen nicht nur eine Rolle in der Embryogenese und bei der Wundheilung (28), sie haben auch anti-angiogene (32) und immunsuppressive (33) Wirkungen. Kleine Hyaluronsäurefragmente unter 20 kDa zeigten einen inflammatorischen, immunstimulierenden und angiogenen Effekt (34). Tetrasaccharide verhindern die Apoptose: Unter Stressbedingungen werden Hitzeschockproteine exprimiert, welche die zellulären Proteine stabilisieren und so die Zelle vor der Denaturierung schützen (28). Diese Oligosaccharide haben in Konzentrationen, wie sie in Tumorgewebe vorkommen, durch angiogene, zellproliferierende und adhäsive Eigenschaften eine tumorunterstützende Funktion (35). Die Molekülgröße der HA wird durch abgestimmte Aktivitäten des Hyaluronsäureanabolismus und Katabolismus fest reguliert.

1.2.3 Hyaluronsäure-Metabolismus

1.2.3.1 Hyaluronsäure-Anabolismus

HA wird durch die drei Isoformen der Hyaluronsäuresynthasen (HAS1, HAS2 und HAS3) synthetisiert. Die drei Synthasegene befinden sich auf drei separaten Chromosomen (Chromosom 19, 8 und 16) und die Enzyme werden selbst im endoplasmatischen Retikulum in inaktiver Form synthetisiert, durch den Golgi-Apparat transportiert und in die Plasmamembran eingebracht. Nach Aktivierung beginnen HAS1, HAS2 und HAS3 alternierend UDP-GlcA und UDP-GlcNAc zu einem wachsenden Polymer zu verknüpfen. Es handelt sich hierbei um doppelköpfige Glykosyltransferasen, welche sich auf und innerhalb der Zellmembran befinden. Auf diese Weise wird HA, aufgrund der enormen Größe, während der Synthese direkt in den Extrazellularraum extrudiert und zu perizellulärer- oder extrazellulärer Matrix zusammengefügt (36), (26). Die Glykolyse liefert die Ausgangsstoffe für die Hyaluronsäuresynthese. UDP-GlcA entsteht aus Glukose-6-Phosphat und UDP-GlcNAc wird aus Fruktose-6-Phosphat gebildet. Der Glukose- und der Hyaluronsäuremetabolismus stehen daher in engem Zusammenhang (27). Die Aktivität der HAS kann durch posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierung und Dimerisierung moduliert werden (37). Eine erhöhte Expression der HAS-Gene ist bei menschlichen Tumoren beschrieben (38). Des Weiteren können posttranslationale Modifikationen die HAS aktivieren (39) und ein erhöhtes

Glukoseangebot (27) kann die Hyaluronsäuresynthese im Tumor entscheidend beeinflussen.

1.2.3.2 Hyaluronsäure-Katabolismus

HA unterliegt einem hochgradig aktiven Metabolismus (40). Der Katabolismus von HA im Gewebe erfolgt entweder enzymatisch über Hyaluronidasen (41) oder durch freie Radikale unter oxidativen Bedingungen (42).

Beim Menschen wurden sechs verschiedene Hyaluronidase-Gene (HYAL1,2,3,4, HYALP1 und PH-20) detektiert, deren Expression entweder gewebespezifisch ist oder auf mikroökologische Reize reagiert (43). Die wichtigsten Hyaluronidasen sind vor allem HYAL-1 und HYAL-2. HYAL-3 hingegen ist zwar weit verbreitet, aber seine Funktion ist unbekannt (41). HYAL-1 und HYAL-2 hydrolysieren die β -1,4-glykosidische Bindung zwischen GlcNAc und GlcA und stellen so Hyaluronsäurefragmente unterschiedlicher Größe her.

HYAL-2 ist an die Plasmamembran gekoppelt und kann die großen Hyaluronsäurepolymere zu ca. 20 kDa bzw. 50-100 Sacchariden spalten. Diese Fragmente werden in Endolysosomkomplexe aufgenommen, in denen das lysosomale säureaktive Enzym HYAL-1 und die Exoglykosidasen überwiegend Tetrasaccharide erzeugen (44), (45).

1.2.4 Hyaluronsäure vermittelte Signalkaskaden

HA kann an Zelloberflächenrezeptoren wie CD44 (*Cluster of differentiation*) (46), RHAMM (Rezeptor für hyaluronvermittelte Motilität) (47), LYVE-1 (Lymphgefäßendothelrezeptor 1) (47), Layilin (48) und HARE (HA Rezeptor für Endozytose) (49) gebunden sein oder durch Bindung an der HAS auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die Interaktion aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden, die schlussendlich zu einer gesteigerten Zellproliferation, Migration und Differenzierung führen.

CD44 ist der am besten untersuchte Rezeptor für HA, welcher in allen Zellen außer in den Erythrozyten exprimiert wird. Es handelt sich um ein transmembranäres Glykoprotein, welches in verschiedenen Isoformen existiert. Zusätzliche Variationen dieses Rezeptors ergeben sich durch posttranslationale Glykosylierungen (26). Verschiedene Isoformen von CD44 sind an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen wie Zellaggregation, Proliferation, Migration und Angiogenese beteiligt (50), (51). CD44 spielt aber auch eine bedeutende Rolle bei der Malignität von Tumorzellen. So ist die Überexpression von Isoformen des Rezeptors am häufigsten mit der

Tumorprogression verbunden, während der Verlust mit der Hemmung des Tumorwachstums assoziiert ist (52). Durch die CD44-induzierten Signalkaskaden werden mehrere Kinase-assoziierte Wachstumsfaktorrezeptoren stimuliert. Dadurch werden Signalkaskaden wie der PI3K-Akt-Weg oder verschiedene andere Kinasen (Src, Fak, Erk und Smad) aktiviert (53). Aber auch die Stimulation von CD44 über G-Proteingekoppelte Rezeptoren wie CXCR4, welche NF κ B aktiviert (54) und der Wnt-Signalweg, welcher in der Aktivierung von β -Catenin endet (55), gehören zu den CD44 vermittelten Signalwegen und fördern so die Proliferation, Migration und Invasion. All diese Signaltransduktionen können die maligne Tumorprogression unterstützen (39).

Ein weiterer Oberflächenrezeptor der HA ist RHAMM. Über diesen Rezeptor wird der mitotische Spindelapparat gebunden, sodass durch diese Interaktion die Zellmigration, Adhäsion und Kontaktinhibition reguliert werden kann. Des Weiteren kann RHAMM auf der Zellmembran mit CD44 kooperieren. Hierdurch kann RHAMM indirekt die tumorfördernden Eigenschaften von CD44 unterstützen (26).

1.3 Die Rolle der Fettsäuren im Tumormetabolismus

Die Rolle des Fettsäuremetabolismus bei der Tumorgenese wurde erst in den letzten Jahren vermehrt zum Gegenstand aktueller Forschung. Krebszellen zeigen neben der Induktion des Warburg-Effektes über Hochregulierung von glykolytischen Proteinen ebenfalls eine Umprogrammierung des Fettsäuremetabolismus (56). Der Warburg-Effekt ist eine Veränderung des Glukosestoffwechsels in Tumorzellen. Der Effekt beschreibt die Fermentation von Glukose zu Laktat, obwohl genügend Sauerstoff für die Verstoffwechselung der Glukose über Pyruvat im Citratzyklus (TCA) vorhanden wäre. Aufgrund des Warburg-Effektes ist die Glukoseaufnahme und der Glukoseverbrauch in Tumorzellen erhöht, es entsteht folglich mehr Laktat und die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien ist vermindert (57). Damit Tumorzellen die hohe Zellteilungsgeschwindigkeit aufrechterhalten können, müssen Stoffwechselwege umprogrammiert werden. Glukose scheint nicht das einzige Substrat zu sein, welches für die zelluläre Biosynthese und ATP-Produktion in Tumorzellen verantwortlich ist, sondern auch der Fettsäurestoffwechsel verändert sich in den schnell proliferierenden Zellen (58), (59). Im Folgenden werden einige Mechanismen aufgeführt, die zu einem veränderten Fettsäurestoffwechsel in Tumorzellen führen:

Krebszellen zeigen im Vergleich zu normalen Zellen eine erhöhte Expression von zytoplasmatischen und mitochondrialen Enzymen, welche an der *de-novo*-Fettsäuresynthese beteiligt sind (60). Die Zellproliferation als wichtiges Merkmal aller Krebszellen benötigt Fettsäuren (FS) für die Biosynthese von Signalmolekülen und

Membranen sowie für die Energiespeicherung, sodass eine Begrenzung ihrer Verfügbarkeit eine therapeutische Strategie in der Tumorthherapie darstellen kann (61). So wird beispielsweise die Tumorgenese behindert, wenn die ATP-Citrat-Lyase gehemmt wird (62). Die ATP-Citrat-Lyase ist ein Schlüsselenzym der Fettsäuresynthese und katalysiert die Umwandlung von Citrat zu Acetyl-CoA (Coenzym A) dem Grundbaustein der FS. Des Weiteren wurde aber auch ein erhöhter Fettsäuresynthespiegel bei verschiedenen Krebsarten beobachtet und ist in vielen Fällen mit einer schlechten Prognose korreliert (61). Außerdem wird die Expression von Desaturasen in Tumorzellen hochreguliert, sodass aus gesättigten FS mehr ungesättigte FS entstehen (63).

All diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Enzyme des Lipidmetabolismus therapeutische Zielstrukturen tumorsuppressiver Therapie sein können. Es existieren bereits einige chemische Inhibitoren der Enzyme des Lipidstoffwechsels (61). Tumorerkrankungen sind vielfältig in ihrer Art und den zu Grunde liegenden genetischen Veränderungen. Ebenso ist der Lipidstoffwechsel ein komplexes Gebilde aus vielen verschiedenen Rückkopplungsmechanismen und Regulierungspunkten. So könnten erfolgreiche Therapien vom Verständnis der spezifischen Stoffwechselanomalien einer bestimmten Tumorart und ihrer grundlegenden Stoffwechselprogrammierung abhängen (61). Indirekte Inhibitoren der β -Oxidation (β -Ox), wie beispielsweise Etomoxir, ein Carnitin-Palmitoyltransferase-1-Inhibitor, kann den zellulären ATP-Spiegel und so das Überleben von Tumorzellen reduzieren (64).

1.3.1 Nomenklatur, Eigenschaften und Funktion der Fettsäuren

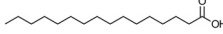
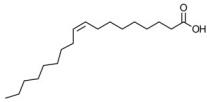
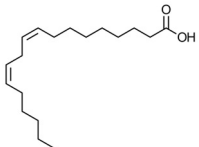
FS sind Monocarbonsäuren, die aus unverzweigten Kohlenstoffketten aus 4 bis 24 Kohlenstoffatomen bestehen und nach ihrer Kettenlänge in kurzkettige- (4-7 Kohlenstoffatome), mittelkettige- (8-12 Kohlenstoffatome) oder langkettige FS (über 12 Kohlenstoffatome) eingeteilt werden. Des Weiteren enthalten ungesättigte FS eine oder mehrere Doppelbindungen, gesättigte FS hingegen haben keine Doppelbindung. Die Stellung der Doppelbindung wird mit griechischen Buchstaben anhand der jeweiligen Lokalisation der Doppelbindung in der Kohlenstoffkette angegeben. Doppelbindungen, welche mehr als 9 C-Atome von der Carboxylgruppe entfernt sind, können vom Organismus nicht selbst synthetisiert werden, sondern müssen als essentielle FS über die Nahrung aufgenommen werden.

Eine besondere Eigenschaft der FS ist einerseits die polare, hydrophile Carboxylgruppe und andererseits die apolare, hydrophobe Kohlenwasserstoffgruppe. So werden in wässriger Umgebung Mizellen oder Lipiddoppelschichten gebildet.

FS werden für die Energiespeicherung, Membranproliferation und die Erzeugung von Signalmolekülen benötigt und sind Bausteine von Acylglycerinen, Phosphoglycerinen, Spingolipiden und Cholesterinestern. Fettsäurederivate sind unter anderem Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene, welche aus mehrfach ungesättigten FS entstehen. Als unveresterte freie FS kommen sie im Gewebe in geringen Mengen vor, im Blutplasma beträgt die Konzentration 0,5-1 mmol/L (65).

In der folgenden Tabelle (Tabelle 1) werden die Eigenschaften der gesättigten C-16 Palmitinsäure, der einfach ungesättigten C-18 Ölsäure und der zweifach ungesättigten C-18 Linolsäure vergleichend dargestellt. Diese drei FS wurden in den Experimenten dieser Dissertation verwendet, da beispielsweise Linolsäure eine besonders wichtige Rolle im Fettsäuremetabolismus spielt. Linolsäure muss mit der Nahrung aufgenommen werden und bildet die Grundlage für die Synthese mehrfach ungesättigter FS wie beispielsweise der Arachidonsäure, welche wiederum für die Synthese von Prostaglandinen notwendig ist. Linolsäure ist besonders in pflanzlichen Ölen und tierischen Fetten enthalten. Palmitinsäure als gesättigte FS ist eine der am häufigsten vorkommende FS. Palmitinsäure ist vor allem in pflanzlichen und tierischen Fetten enthalten und bedeutend in der Lipogenese (66). Des Weiteren ist Palmitinsäure eine der am häufigsten in Tumorzellen vorkommende FS (67). Ölsäure ist unter anderem Bestandteil von Triacylglyceriden und findet sich vor allem in Olivenöl.

Tabelle 1: Darstellung der verwendeten Fettsäuren

Name	Summenformel	Vorkommen
Palmitinsäure gesättigte FS 	$C_{16}H_{32}O_2$	Bestandteil tierischer und pflanzlicher Lipide
Ölsäure (18:1, ω -9) einfach ungesättigte FS 	$C_{18}H_{34}O_2$	Hauptbestandteil aller Naturfette und Öle, Olivenöl
Linolsäure (18:2, ω -6) Zweifach ungesättigte FS 	$C_{18}H_{32}O_2$	In Pflanzenölen und Depotfett, insbesondere Distelöl, Sonnenblumenöl, tierische Fette

1.3.2 Fettsäuremetabolismus

Im Folgenden wird der Metabolismus der FS näher aufgeführt. Abgebaut werden die FS mithilfe der β -Ox, wobei letztendlich Energie in Form von ATP freigesetzt wird. In normalen, nicht transformierten Zellen ist das Gleichgewicht zwischen Fettsäuresynthese und β -Ox einerseits abhängig vom Ernährungszustand und andererseits von dem mitochondrialen Stoffwechsel im Gewebe. Nicht essentielle FS können über die Fettsäuresynthese vom Organismus selbst hergestellt werden

1.3.2.1 Fettsäure-Anabolismus

Die Biosynthese der FS erfolgt durch Kondensation von Acetyleinheiten (2 C-Atome), sodass der größte Teil der im Organismus vorkommenden FS eine gerade Anzahl von C-Atomen enthält. Alle Teilschritte finden im Zytosol statt und werden durch die multifunktionelle Fettsäuresynthase mithilfe von Malonyl-CoA als Substrat katalysiert. Als Startermolekül für die Fettsäuresynthase fungiert das Acetyl-CoA, an welches Acetatreste angehängt werden, die vom mehreren Malonyl-CoA Substraten stammen. Das Acetyl-CoA stammt unter anderem aus Pyruvat (Endprodukt der Glykolyse), aus der β -Ox oder aus Citrat. Citrat wird über die ATP-Citrat-Lyase zu Oxalacetat und Acetyl-CoA verstoffwechselt und über den Citratshuttle (CS) über die innere Mitochondrienmembran ins Zytosol transportiert. Das Substrat Acetyl-CoA nimmt eine zentrale Rolle in dieser Dissertation ein. Durch mehrere chemische Reaktionen

(Kondensation, Dehydratisierung, Reduktion) synthetisiert die Fettsäuresynthase einen gesättigten Acylrest. Danach läuft dieser Vorgang erneut ab, solange bis beispielsweise eine Palmitinsäure aus 16 C-Atomen entstanden ist. Langkettige gesättigte FS können anschließend durch Desaturasen zu einfach ungesättigten FS entsättigt werden, wobei Doppelbindungen eingefügt werden. Damit die FS am Ende zur Triacylglyceringewinnung verwendet werden können, müssen sie durch Acyl-CoA-Synthetasen aktiviert werden (65), (61).

1.3.2.2 Fettsäure-Katabolismus

Der Fettsäureabbau findet unter aeroben Bedingungen intramitochondrial statt, nachdem die FS im Zytoplasma in einer ATP-abhängigen Reaktion durch die Thiokinase aktiviert wurden. Es folgt der Transport durch Poren über die äußere Mitochondrienmembran. Die innere Mitochondrienmembran wird mittels Carnitin-Shuttle passiert. Acyl-CoA wird auf Carnitin übertragen und wieder an ein CoA in der Mitochondrienmatrix abgegeben, sodass Citrat regeneriert werden kann. In der β -Ox werden anschließend die FS in einem sich wiederholenden Prozess schrittweise zu Acetyl-CoA abgebaut. Ein Zyklus besteht aus insgesamt vier Reaktionen: zwei Oxidationen, eine Hydratisierung sowie eine thiolytische Abspaltung von Acetyl-CoA. Auf diese Weise kann ein vollständiger Abbau geradzahliger FS zu Acetyl-CoA erfolgen, wobei alle Enzyme der β -Ox in Kettenlängen-spezifischen Isoformen existieren. Ungesättigte FS, welche eine oder mehrere cis-Doppelbindungen enthalten, können nach Auflösung der Doppelbindung durch Isomerisierung und Hydratisierung in die β -Ox eingeschleust werden. Beim Abbau ungeradzahliger FS entsteht Propionyl-CoA, welches in einer Biotin- und Cobalamin-abhängigen Carboxylierung zu Succinyl-CoA umgewandelt werden kann und weiter zu Pyruvat verstoffwechselt wird. Sehr langkettige FS über 22 C-Atome werden in Peroxisomen gekürzt. Bei der β -Ox entstehen große Mengen an $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 , welche in der Atmungskette ATP erzeugen (65), (61).

1.3.3 Interaktion zwischen Hyaluronsäuresynthese und Tumorfettsäuremetabolismus

In 1.3.2.2 wurde beschrieben, dass FS in der β -Ox zu mehreren Acetyl-CoA Molekülen abgebaut werden. Des Weiteren wurde in 1.2.3.1 die Synthese der HA aus Glukosevorstufen aufgeführt. Bei Wirbeltieren gibt es bisher keine Hinweise dafür, dass das Acetyl-CoA aus der β -Ox in die Glukoneogenese eingespeist werden kann. Die Glukoneogenese ist die körpereigene Synthese von Glukose aus Pyruvat und findet

beispielsweise in den Hepatozyten statt. Durch die Glukoneogenese kann so beispielsweise der Blutzuckerspiegel angehoben werden.

Bisher ist nicht beschrieben, dass Acetyl-CoA aus der β -Ox zunächst in Pyruvat und dann weiter in der Glukoneogenese zu Glukose und somit auch zu HA umgewandelt werden könnte.

Die Ursache, warum aus Acetyl-CoA kein Pyruvat gebildet werden kann, liegt darin, dass die Pyruvatdehydrogenase eine einseitige irreversible Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA bewirkt. Diese Reaktion koppelt die Glykolyse an den TCA im Mitochondrium (Abbildung 21).

Beim Abbau ungeradzahliger FS werden genau wie beim Abbau geradzahliger FS zunächst Acetyl-CoA-Einheiten gebildet. Zuletzt entsteht jedoch beim Abbau ungeradzahliger FS Propionyl-CoA, welches über Enzyme zunächst zu Succinyl-CoA umgewandelt wird. Succinyl-CoA wird letztendlich zu Pyruvat verstoffwechselt, sodass über die Glukoneogenese Bausteine der HA gebildet werden könnten. Dieser Anteil ist jedoch minimal. Es entsteht deutlich mehr Acetyl-CoA bei der β -Ox, welches im TCA zu Energie umgewandelt wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass daher keine relevante Interaktion zwischen dem Fettsäuremetabolismus und der Hyaluronsäuresynthese beschrieben ist.

Eine weitere mögliche Interaktion zwischen dem Fettsäuremetabolismus und der Hyaluronsäuresynthese ist der Glyoxylatzyklus. Der Glyoxylatzyklus ermöglicht es Pflanzen, Pilzen und Bakterien aus Fetten Kohlenhydrate zu synthetisieren (68). Aus dem Acetyl-CoA der β -Ox kann in Kombination mit Oxalacetat zunächst Citrat gebildet werden. Das Citrat wird weiter zu Isocitrat verstoffwechselt. Danach bildet die Isocitratlyase Succinat und Glyoxylat aus dem Isocitrat. Das Glyoxylat wird wieder in mehreren Schritten zu Oxalacetat regeneriert, sodass der Glyoxylatzyklus erneut ablaufen kann, solange genügend Acetyl-CoA aus der β -Ox vorhanden ist. Das Succinat stellt hier die entscheidende Verbindung zwischen dem Fettsäureabbau und der Kohlenhydratsynthese dar. Das Succinat kann in mehreren Schritten zu Phosphoenolpyruvat umgesetzt werden, welches in die Glukoneogenese eingeschleust werden kann. Auf diese Weise kann also in Pflanzen, Pilzen und Bakterien aus dem Acetyl-CoA der β -Ox die Glukoneogenese stimuliert werden und so könnten dann theoretisch auch aus den Glukosevorstufen HA gebildet werden. Wirbeltieren fehlen jedoch die für den Glyoxylatzyklus notwendigen Enzyme Isocitratlyase und

Malatsynthese, sodass die Existenz des Glyoxylatzyklus in menschlichen Zellen nicht beschrieben ist.

1.4 Ziele der Arbeit

HA als wichtiger Faktor in der Tumorentstehung fördert die Invasion, Angiogenese, Metastasierung und Chemotherapieresistenz der Tumorzellen.

Der Effekt der Metabolisierung von FS auf die Tumorphiliferation ist nur unzureichend untersucht. Ebenso konnte bisher kein Zusammenhang zwischen dem Fettsäuremetabolismus und der Hyaluronsäuresynthese gefunden werden. Die folgende Fragestellung nimmt eine zentrale Rolle dieser Arbeit ein:

Welchen Einfluss hat das Fettsäureangebot auf die Hyaluronsäuresynthese in ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen?

Die Ziele der Arbeit sind daher:

1. *In vitro*: Die Analyse des Einflusses von verschiedenen FS auf die Hyaluronsäuresynthese in ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen und in Hautfibroblasten
2. *In vivo*: Die Analyse der Auswirkungen einer kohlenhydrat- oder fettreichen Diät auf die Hyaluronsäurematrix und auf das Tumorwachstum im Xenograft-Nacktmausmodell

Diese Ziele der Arbeit sind aufgrund der weitverbreiteten Anwendung von ketogenen Diäten im Rahmen der supportiven Tumortherapie von hohem klinischen Interesse.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsmittel

2.1.1 Substanzen

Alle Substanzen, die nicht näher spezifiziert sind, wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

2.1.2 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absorptionsmessgerät	Syngery Mx	Biotek
Kryostat	CM 1850	Leica
Mikroskop, invers	Axio Observer.Z1	Zeiss

2.1.3 Hersteller

Tabelle 3: Herstellerverzeichnis

Hersteller	Hauptsitz
Charles River Laboratories	Wilmington, MA, USA
Corgenix Medical Corporation	Broomfield, CO, USA
Corning	Corning, NY, USA
DAKO	Hamburg, Deutschland
DSMZ	Braunschweig, Deutschland
Graphpad Software	La Jolla, CA, USA
Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Leica	Wetzlar, Deutschland
Promocell	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Ssniff-Spezialdiäten	Soest, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Zeiss	Oberkochen, Deutschland

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellkultivierung

Alle Experimente in der Zellkultur wurden mit der humanen ösophagealen Plattenepithelkarzinomzelllinie KYSE-410 (KYSE) (ACC 381, Leibniz Institut DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen + Zellkulturen GmbH) und mit humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) (F, C-12300, Promocell) durchgeführt. Die KYSE wurden in Tumorzellmedium RPMI (Rosewell Park Memorial Institut) mit 2 g/L Glukose und Zusatz von Penicillin/Streptomycin (PS) sowie 10%igem fetalem Kälber-Serum (FCS) bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Die Kultivierung der NHDF erfolgte in DMEM (Dulbecco's Modiefied Eagle Medium) mit 4,5 g/L Glukose, PS und 10 % FCS unter gleichen Bedingungen. Bei ausreichender Konfluenz (80 - 90 %) wurden die Zellen mit einer 0,5%igen Trypsin/EDTA (TE) – Lösung gelöst und mit einer Dichte von 10⁴ Zellen/cm² ausgesät. Kultivierungssubstanzen wurden von der Firma Gibco Thermo Fischer verwendet.

2.2.2 Versuchsaufbau *in vitro*

Grundlegend für alle Zellkulturexperimente war folgender Versuchsaufbau:

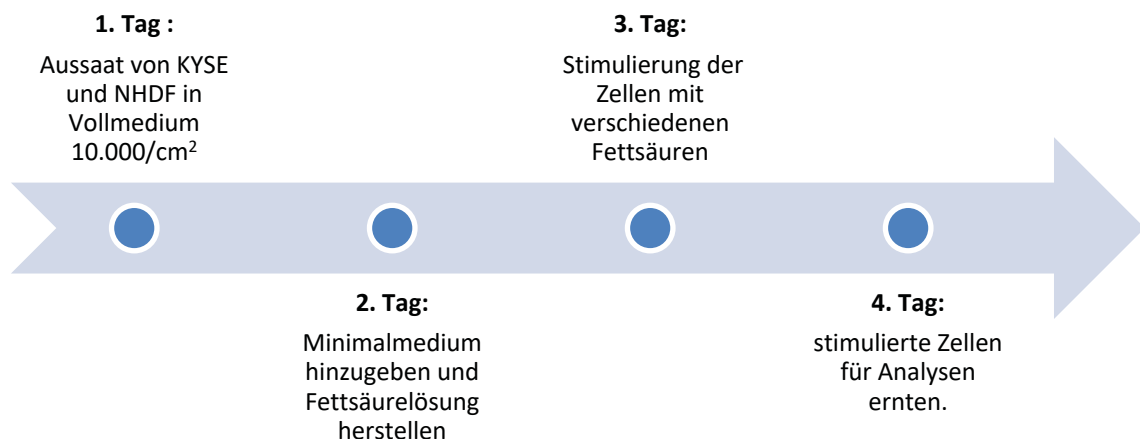


Abbildung 1: Versuchsaufbau *in vitro*

Für alle *In-vitro*-Versuche wurden am ersten Tag die KYSE und NHDF jeweils separat in Vollmedium ausgesät und über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag wurde das Vollmedium durch ein Minimalmedium (siehe 2.2.3) ersetzt, sodass sich die Zellen nicht weiter vermehren konnten. Am selben Tag wurde noch die Fettsäurelösung für den dritten Versuchstag hergestellt, welche über Nacht geschüttelt werden musste. Am dritten Tag konnten die Zellen dann mit den verschiedenen Fettsäuren stimuliert werden. Die Kontrollgruppe erhielt bovines Serumalbumin. Am vierten Tag wurden die Zellen für die weiteren Analysen geerntet.

2.2.3 Etablierung Minimalmedium

Für den oben beschriebenen Versuchsaufbau (siehe 2.2.2) wurde DMEM, ein Minimalmedium (MM) ohne Zucker, Glutamin und Phenolrot (Gibco Thermo Fischer; A1443001) benutzt und PS hinzugefügt. Des Weiteren wurden jeweils einzelne verschiedene Nährstoffe unterschiedlicher Konzentrationen in das MM hinzugegeben. Pro Versuch wurde immer nur ein Nährstoff auf die KYSE und NHDF gegeben und das Überleben der Zellen abhängig vom jeweiligen Nährstoff beobachtet. Die verschiedenen Nährstoffzugaben waren einmal 40 mmol Glutamin und Glukose in den Konzentrationen 50 mg/L, 100 mg/l, 200 mg/l und 500 mg/l. Ziel der Etablierung war es, den minimalen Nährstoffzusatz herauszufinden, bei dem die NHDF und KYSE überlebten, sich jedoch nicht weiter vermehren konnten. Unter diesen Bedingungen mussten die Zellen einen Tag mit dem minimalen Nährstoffzusatz hungern, sodass die Zellen am dritten Tag die FS als Energiequelle genutzt haben.

2.2.4 Etablierung Fettsäurelösung

Für die Herstellung einer 200 mM Fettsäurelösung (FSL) wurde zunächst Palmitat als Feststoff (*Palmitic acid*, Sigma-Aldrich; P0500) oder Oleat- (*Oleic acid*, Sigma-Aldrich; O1383) bzw. Linoleat-Lösung (*Linoleic acid*, Sigma-Aldrich; L1012) in 100%igem Ethanol gelöst. Die entstandene 200 mM FSL wurde anschließend mit einer fettsäurefreien 12,5%igen Albuminlösung (Sigma-Aldrich; A8806) 1:20 verdünnt. Während der Etablierung wurde ebenfalls das Mischungsverhältnis 1:40 getestet. Am zweiten Tag des Versuchsaufbaus wurden vier leere Reaktionsgefäße zunächst mit Stickstoff begast, um später eine ungewollte Fettsäureoxidation der FSL zu verhindern. Danach wurde jeweils 475 μ l der fettsäurefreien Albuminlösung vorgelegt und 25 μ l der entsprechenden FS hinzugegeben. Eines der vier Reaktionsgefäße enthielt bei jedem Versuch 476 μ l fettsäurefreie Albuminlösung und je 8 μ l der Oleatlösung, 8 μ l der Linoleatlösung und 8 μ l der Palmitatlösung, sodass ebenfalls insgesamt ein FS Anteil von ca. 25 μ l erreicht werden konnte. Anschließend erfolgte eine erneute Begasung der gefüllten Reaktionsgefäße. Danach wurden diese für 20 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden je 55 μ l der entsprechenden FS, entweder Linol-, Öl-, Palmitinsäure oder eine Mischung aus allen drei FS, in das MM der Zellen gegeben. Der Kontrollgruppe wurde am dritten Tag lediglich bovines Serumalbumin (BSA) ohne FS angeboten. Die Endkonzentration der FSL auf den Zellen in der 12-Loch-Platte betrug jeweils 0,025 mM. Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden bis zur Analyse am vierten Tag inkubiert.

2.3 Immunzytochemie

2.3.1 BODIPY-Färbung

Die Färbung von Fetten in den Zellen erfolgte mit 4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacen (BODIPY™ 493/503; Thermofisher; D3922) (69). KYSE und NHDF wurden dazu auf Deckgläschen ausgesät und am vierten Tag geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) gewaschen, mit 4%igem Formalin fixiert und erneut gewaschen. Dann wurde BODIPY in einer Endkonzentration von 3,8 mM für 10 Minuten hinzugegeben, erneut gewaschen und eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 (1:1000, 5 min, H3570; Thermo Fisher) vorgenommen. Die Proben wurden fluoreszenzmikroskopisch mit einer einheitlichen Belichtungszeit an einem inversen Mikroskop Axio Observer Z (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) ausgewertet. Es wurden pro Probe je fünf zufällige Regionen in 20-facher Vergrößerung aufgenommen und auf die Negativkontrolle normiert. Vor der Auswertung wurden die Bilder mit der Mikroskopie-Software ZEN (Version 6.1.7601, Zeiss) auf die Negativ-Kontrolle normiert. Es folgte eine Konvertierung der Bilder in das TIFF-Format (Tagged Image File Format), wobei Einzelkanalbilder und Mehrkanalbilder erstellt wurden, die für die weitere Auswertung mit dem Bildanalyseprogramm ImageJ (Version 1.52, NIH) erforderlich waren. Es wurde hierbei ein Verhältnis gebildet aus dem Produkt der mittleren Signalstärke pro Fläche (IntDen) und der Anzahl der Zellkerne. Die Zellkerne wurden mit dem folgenden *Makro* gezählt:

```
run("8-bit");
run("Auto Threshold", "method=passenderKanal");

run("Watershed");

run("Analyze Particles...", "size=0.05-Infinity display include
summarize")
```

Zum Schluss wurde noch das prozentuale Ergebnis zur Kontrolle mit BSA ermittelt und die Daten wurden in die Software Graph Pad Prism 7.00 überführt.

2.3.2 Hyaluronsäure-Quantifizierung

2.3.2.1 HABP-Immunaффinitäts-Assay

Die Hyaluronsäurekonzentration im Überstand von KYSE und NHDF wurden nach Beendigung des Versuches am vierten Tag mit einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-ähnlichen immunoturbidimetrischen *Hyaluronsäure Acid Test* (Corgenix) nach Herstellerangaben bestimmt.

2.3.2.2 Hyaluronsäurebindeprotein-Färbung

KYSE und NHDF wurden jeweils auf Deckgläschen ausgesät und nach Versuchsende am vierten Tag mit warmen DPBS gewaschen und in 4%igem Paraformaldehyd für 20 Minuten fixiert. Es wurde hierfür eine spezialisierte Fixierlösung, bestehend aus einer phosphatgepufferten Salzlösung mit 4 % Paraformaldehyd, 70 % Ethanol und 0,5 % Essigsäure verwendet. Nach erneutem Waschvorgang wurden die Zellen mit einer 5%igen BSA-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, um unspezifische Bindungsstellen in den Zellen zu eliminieren. Es folgte der nächste Waschvorgang und die Zellen wurden über Nacht bei 4 °C mit Biotin-gekoppeltem HABP (1:200; Calbiochem, 385911) inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte nach einem weiteren Waschschrift die einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit FITC-markiertem Streptavidin (1:1000; DAKO, F044). Zum Schluss folgte für fünf Minuten die Kernfärbung mit Hoechst 33342 (1:1000, H3570; Thermo Fisher) ebenfalls bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden mittels VectaShield (Vector Laboratories) eingedeckt und mit dem inversen Mikroskop Axio Observer Z (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) fluorenszenzmikroskopisch aufgenommen. Die weitere Auswertung erfolgte analog zu der BODIPY-Färbung mittels ImageJ (Version 1.52, NIH).

2.4 *In-vivo*-Versuche

2.4.1 Xenograft Nacktmausmodell

Als Versuchstiere wurden 7 Wochen alte männliche NMRI-Nu-Mäuse verwendet (Charles River Laboratories), die eine T-Zelldepletion aufwiesen, welche durch eine autosomal rezessive Mutation des Gens Foxn1 (Forkhead box N1) auf Chromosom 11 verursacht wird. Diese Mutation bewirkt eine Aplasie des Thymus mit einer auf T-Lymphozyten beschränkten Immundefizienz. Die B-Lymphozyten bleiben dabei normal funktionsfähig. Eine beeinträchtigte Immunantwort war für das Xenograft-Nacktmausmodell von besonderer Bedeutung, denn das Immunsystem der Mäuse sollte die injizierten humanen KYSE nicht bekämpfen. Es war wichtig, die Tiere in einem Raum mit erhöhten Hygieneanforderungen zu halten, um das Risiko einer Infektion zu minimieren. Es wurden Typ 2 Makrolonkäfige (350 cm²) mit Filterhaube verwendet und maximal vier Mäuse pro Käfig gehalten. Genehmigt wurde dieser Tierversuch vom LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz) mit der AZ-Nummer: 84-02.04.2013.A471.

2.4.2 Versuchsaufbau *in vivo*

Am Tag -5 (Start der Versuchsreihe, siehe Abbildung 2) wurde aus 24 Nacktmäusen zufällig drei Gruppen gebildet. Jeweils acht Mäuse bildeten die Kontrollgruppe (KON-Gruppe), die Fettgruppe (FETT-Gruppe) und die Kohlenhydratgruppe (CHO-Gruppe). Ab Versuchsbeginn bekamen die jeweiligen Gruppen das entsprechende Versuchsfutter (Tabelle 4): Als Kontrollfutter wurde das Allgemeinfuttermittel für Mäuse in der Zucht verwendet, welches die ZETT (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben) für alle Mäuse benutzt (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest; V1184-300). Fettfutter war gekennzeichnet durch einen hohen Fettanteil von 30 % (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest; S1130-E010); Kohlenhydratfutter enthielt einen niedrigen Fettanteil von nur 5 % (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest; S1130-E005). Alle drei Futtermittelvariationen hatten dennoch denselben Energiegehalt pro Gramm Futter. Detaillierte Angaben bezüglich der Futterzusammensetzung werden in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Futterzusammensetzung

Inhaltsstoffe %	Kontrollfutter	Fettfutter	Kohlenhydratfutter
Rohprotein	23	26,5	17,6
Rohfett	6,1	30,2	5,1
Rohfaser	3,3	13,1	5,0
Rohasche	6,8	5,4	5,4
Stärke	34,1	-	30,8
Zucker	5,1	-	13,0

Am Tag 0 wurden die KYSE subkutan jeweils beidseitig in die Flankenregion der Mäuse injiziert. Dazu wurden die KYSE kultiviert und pro Tumor 10^6 Zellen in $50 \mu\text{l}$ Vollmedium aufgenommen und mit $50 \mu\text{l}$ Matrigel mit reduziertem Wachstumsfaktor-Anteil (Corning, 356231) versetzt und den Mäusen injiziert. Um die Futteraufnahme zu kontrollieren, wurden die Mäuse montags, mittwochs und freitags gewogen. Ab Tag 16 waren die Tumore mit einem digitalen Messschieber (Alpha Tools) messbar und wurden von diesem Zeitpunkt an dreimal wöchentlich vermessen und auf die entsprechenden Versuchsabbruchkriterien kontrolliert. Für die Erhebung des Tumolvolumens (TV) wurde jeweils die Länge, Breite und Höhe gemessen und mit 0,52 multipliziert (70). Die Mäuse wurden aus dem Versuch genommen, wenn eines der beiden Kriterien Kantenlänge über 15 mm oder TV über 1500 mm^3 vom Tumor erfüllt wurde. Die statistische Auswertung der Tumolvolumina erfolgte an Tag 42, da zu diesem Zeitpunkt alle Mäuse der Kontrollgruppe die maximale Kantenlänge überschritten hatten. Die Tumore wurden

freipräpariert, entnommen, in Kryomedium eingebettet und in Isopentan und flüssigem Stickstoff (-196 °C) schonend schockgefroren und für weitere Analysen bei -80 °C zwischengelagert.

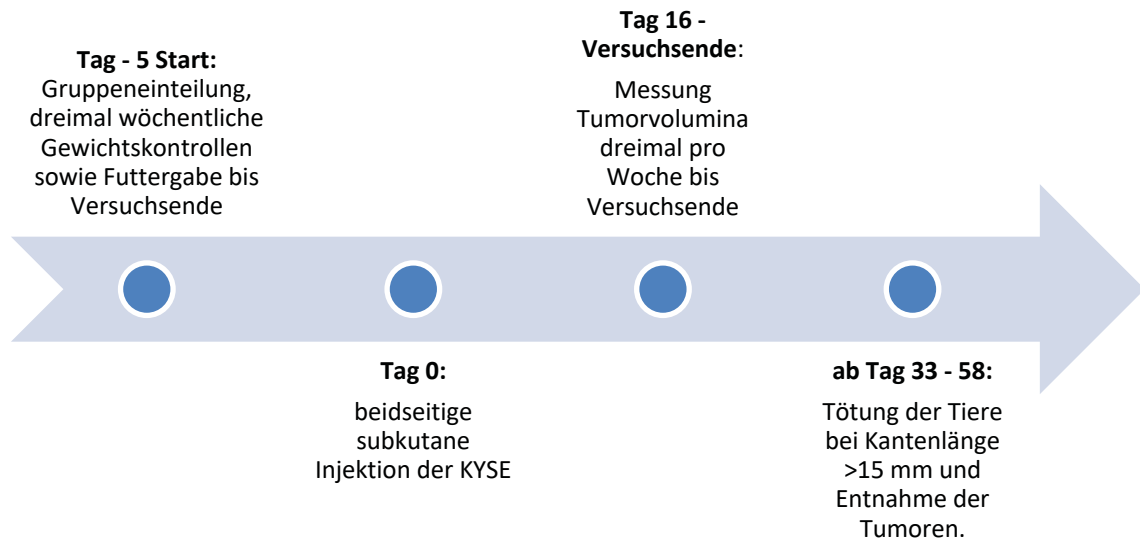


Abbildung 2: Versuchsaufbau *in vivo*

Zu Beginn des *In-vivo*-Versuches an Tag -5 wurden 24 Mäuse in drei gleich große Gruppen eingeteilt, welche das der Gruppe entsprechende Futter bis zum Versuchsende erhielten. Weiterhin wurde dreimal wöchentlich das Gewicht der Mäuse vermerkt. An Tag 0 wurde allen Mäusen die KYSE-Zellen subkutan beidseits in die Flankenregion injiziert. Ab Tag 16 konnte dreimal wöchentlich das Tumorzumina vermessen werden. Hatten die Tumore eine Kantenlänge von >15 mm oder ein Volumen von 1500 mm³ erreicht, wurden die Tiere getötet und die Tumore für weitere Analysen entnommen.

2.5 Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Ein bestimmtes Epitop auf einem Antigen des Gewebes reagiert dabei mit dem hinzugegebenen Antikörper. Bei der in dieser Arbeit verwendeten indirekten Methode wird zunächst ein Primärantikörper verwendet, an den ein Sekundärantikörper bindet, der mit einem Fluorophor gekoppelt ist. Die Auswertung erfolgt mit einem fluoreszenzmikroskopischen Verfahren, bei dem das Fluorophor mit der entsprechenden Wellenlänge angeregt wird und die resultierende Fluoreszenz quantifiziert werden kann.

2.5.1 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Zunächst wurden am Kryostat (Leica CM1850) 5 µm dicke Schnitte von den eingebetteten Tumoren angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen, über Nacht getrocknet und bei -20 °C trocken zwischengelagert.

Es folgte eine Doppel- und eine Dreifachfärbung der Kryoschnitte. Die Doppelfärbung färbte den Hyaluronsäurerezeptor CD44 in Kombination mit dem epithelialen

Zelladhäsionsmolekül EpCAM, wodurch die Tumorzellen sichtbar gemacht wurden und folglich vom Bindegewebe abgegrenzt werden konnten. Bei der Dreifachfärbung wurde HA mittels HABP, FS mittels BODIPY, und die Krebszellen mittels EpCAM gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (H3570; Thermo Fisher). Die Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe können den folgenden Tabellen entnommen werden (Tabelle 5, Tabelle 6, Tabelle 7).

Tabelle 5: Primärantikörper für die Immunhistologie

Name	Katalognummer	Hersteller	Verhältnis
Anti-CD44	HPA005785	Sigma-Aldrich	1:200
EpCAM	MA5-12153	ThermoFisher	1:100
HABP, biotinylated	385911	Calbiochem	1:100

Tabelle 6: Sekundärantikörper für die Immunhistologie

Name	Katalognummer	Hersteller	Verhältnis
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Hase	A11034	ThermoFisher	1:400
Alexa Fluor 568 Ziege anti-Maus	A11019	ThermoFisher	1:200
Alexa Fluor 647 Esel anti-Maus	A31571	ThermoFisher	1:200
Streptavidin (Cy3)	SA1010	ThermoFisher	1:200

Tabelle 7: Fluoreszenzfarbstoffe für die Immunhistologie

Name	Katalognummer	Hersteller	Verhältnis
BODIPY TM 493/503	D3922	Invitrogen	1:400
Hoechst 33342	H3570	Invitrogen	1:1000

2.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Die Kryoschnitte wurden mit Aceton für 20 Minuten bei 4 °C fixiert. Es folgte ein Waschschriff mit DPBS. Da in der Dreifachfärbung HA gefärbt wurde, mussten unspezifische Bindungsstellen, die sich im Mausgewebe befanden, mit einer Avidin-Biotin-Blockierlösung (ThermoFisher, TA-015-BB) blockiert werden. Es erfolgte daher eine Blockierung mit 1%igem BSA bei Raumtemperatur für eine Stunde, um die unspezifischen Proteinbindungsstellen zu eliminieren. Im Anschluss wurden die Proben über Nacht mit dem Erstantikörper inkubiert. Die Konzentrationen können in Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 eingesehen werden. Am nächsten Tag wurden die Proben

gewaschen und der Zweitantikörper wurde mit der entsprechenden Konzentration für eine Stunde im Dunkeln aufgetragen. Nach erneutem Waschen erfolgte die Kernfärbung mit Hoechst 33342 (H3570; Thermo Fisher). Im Anschluss wurden die Objektträger mit VectaShield (Vector Laboratories) eingedeckt und konnten fluorenszenzmikroskopisch beurteilt werden. Pro Objektträger wurde eine interne Negativkontrolle von fünf zufällig ausgewählte Regionen bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die Bildverarbeitung erfolgte ebenfalls mit der Mikroskopie-Software ZEN. Auch hier erfolgte die Formatierung in das TIFF-Format, wobei jeder Kanal einzeln sowie ein Mischbild aus allen Kanälen erstellt wurde.

2.5.3 Auswertung mit ImageJ

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde die Bildverarbeitungssoftware ImageJ (Version 1.52, NIH) verwendet. Mithilfe der EpCAM-Färbung, welche lediglich den Tumor anfärbte, konnte das Tumorgewebe vom Stroma abgegrenzt werden. Manuell wurde dazu bei jedem Bild das Tumorgewebe umrandet. Es wurde pro Färbung ein *Makro* erstellt, welches von jedem Bild die Intensität der Fluoreszenzsignale vom Tumor und vom Stroma gemessen hat. Um die ImageJ Software für die Dreifachfärbung zu nutzen, wurde das gemessene HABP-Signal für die Auswertung in Blau umgestellt. In beiden Färbungen wurde die IntDen gemessen und der Mittelwert (MW) pro Tumor und pro Stroma errechnet. Die weitere Auswertung erfolgte in Graph Pad Prism 7.00.

2.6 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Graphpad Prism 7.00 (Graphpad Software). Datensätze aus mehr als zwei Gruppen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) und nachgeschaltetem *post-hoc*-Test nach Tukey oder Sidak bestimmt. Die Daten sind als MW \pm Standardfehler des MW (SEM) dargestellt. Statistische Signifikanz wurde bei einem Wert von $p \leq 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierungen

Bevor die *In-vitro*-Versuche durchgeführt werden konnten, musste die Zusammensetzung der FSL und des MM etabliert werden.

3.1.1 Etablierung Minimalmedium

In den *In-vitro*-Versuchen wurde der Einfluss von FS auf die Aufnahme von Fetten und auf die Hyaluronsäuresynthese quantifiziert. Dafür war es von besonderer Bedeutung, dass das Nährmedium der Zellen kaum Nährstoffe enthielt, sodass die Effekte auf die hinzugegebenen FS zurückzuführen waren. Die Zellen konnten sich hauptsächlich von FS ernähren, da ihnen kaum andere Nährstoffe angeboten wurden. Wie bereits in den Methoden (2.2.3) beschrieben, wurde DMEM ohne Glukose, Glutamin und Phenolrot verwendet. Das MM wurde zunächst auf die Zellen gegeben. In diesem Medium konnten die NHDF im Gegensatz zu den KYSE über 24 Stunden überleben. Es waren dafür keine Zusätze notwendig (Abbildung 3). Es zeigte sich also eine vergleichbare Vitalität und Konfluenz der NHDF die mit MM kultiviert wurden im Vergleich zu den NHDF, welche DMEM mit 1g Glukose erhalten haben.

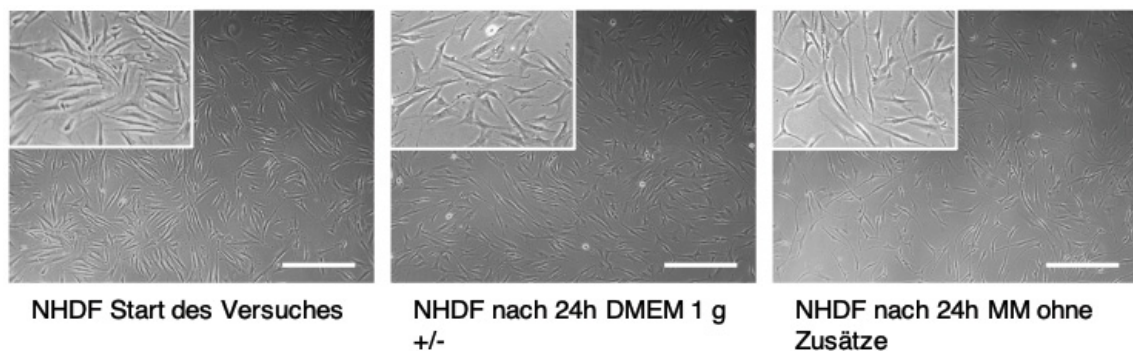


Abbildung 3: Das Überleben von NHDF in Minimalmedium ohne Zusätze

NHDF wurden zu Beginn des Versuches in Vollmedium (DMEM +/-) (links) und anschließend für 24 Stunden in DMEM +/- (mitte) oder in Minimalmedium (rechts) kultiviert. Die Angabe +/- bzw. +/- bezieht sich darauf, ob Penicillin/Streptomycin enthalten war. Ein + bedeutet, es war enthalten, ein - bedeutet es war nicht enthalten. Das zweite Zeichen nach dem Schrägstrich bedeutet analog dazu, ob 10 % FCS enthalten war oder eben nicht enthalten war. Die Morphologie und Vitalität der Zellen wurden mittels Lichtmikroskop kontrolliert. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder einer 5-fachen und einer 20-fachen Vergrößerung (Bildausschnitt oben links). Maßstabsbalken: 500 μm , (n=1).

Die KYSE hingegen konnten in reinem MM ohne Zusätze nicht über 24 Stunden kultiviert werden. Die KYSE lösten sich vom Boden der 12-Loch-Platte ab und schwammen im Medium (Abbildung 4). In RPMI hingegen konnten die KYSE kultiviert werden.

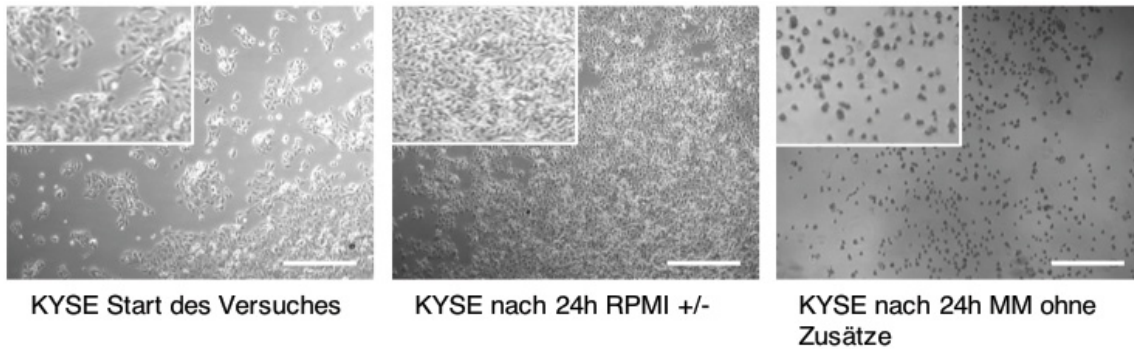


Abbildung 4: Das Überleben von KYSE in Minimalmedium ohne Zusätze

KYSE wurden zu Beginn des Versuches in Vollmedium (RPMI +/+) (links) und anschließend für 24 Stunden in RPMI +/- (mitte) oder in Minimalmedium (rechts) kultiviert. Die Angabe +/- bzw. +/+ bezieht sich darauf, ob Penicillin/Streptomycin enthalten war. Ein + bedeutet, es war enthalten, ein - bedeutet es war nicht enthalten. Das zweite Zeichen nach dem Schrägstrich bedeutet analog dazu, ob 10 % FCS enthalten war oder eben nicht enthalten war. Die Morphologie und Vitalität der Zellen wurden ebenfalls mittels Lichtmikroskop kontrolliert. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder einer 5-fachen und einer 20-fachen Vergrößerung (Bildausschnitt oben links). Maßstabsbalken: 500 μm , (n=1).

Diese Erkenntnis verdeutlicht, dass minimale Nährstoffe dem MM der KYSE zugesetzt werden mussten, damit diese über mindestens 24 Stunden kultiviert werden konnten. Zunächst wurden verschiedene Glukose- oder Glutaminkonzentrationen hinzugefügt, da diese Zusätze auch im Vollmedium RPMI enthalten waren. Mit dem Zusatz von 40 mmol Glutamin konnten die KYSE nicht überleben. Es stellte sich heraus, dass ein Glukosezusatz notwendig war, damit die KYSE überleben konnten. Dabei konnte kein Unterschied in der Konfluenz zwischen dem Zusatz von 1000 mg/L, 500 mg/L, 200 mg/L und 100 mg/L Glukose festgestellt werden. Die KYSE überlebten mindestens 24 Stunden unter Zugabe von verschiedenen Glukosekonzentrationen, allerdings vermehrten sie sich nicht so stark wie unter der Kontrolle mit RPMI +/-.

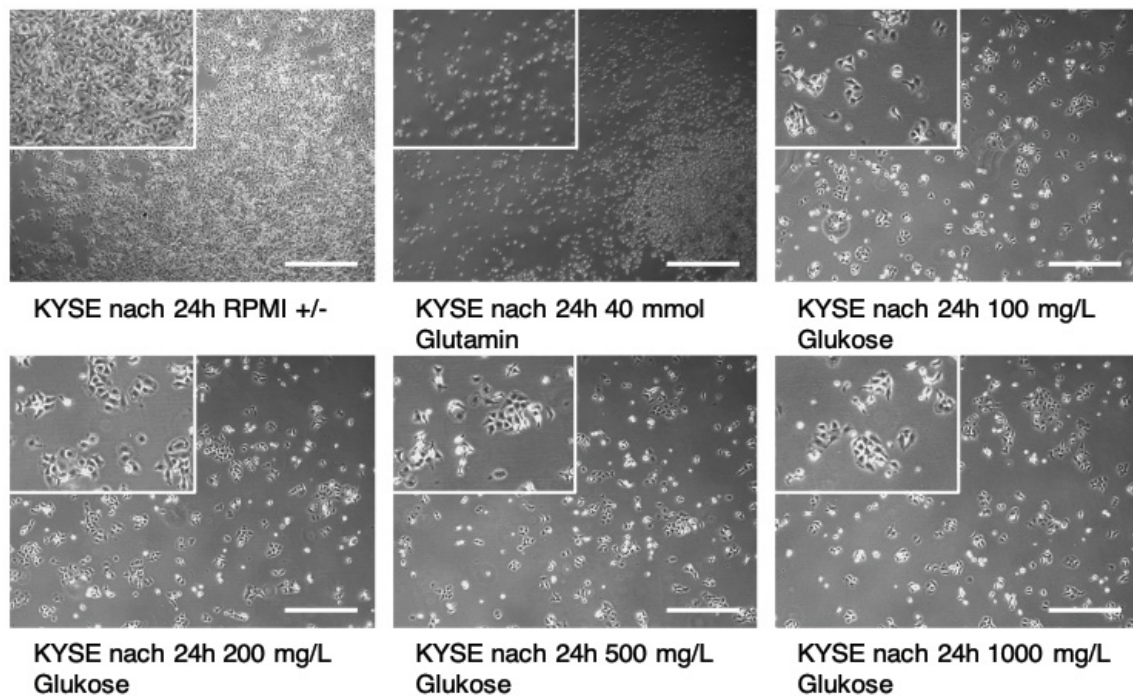


Abbildung 5: Das Überleben von KYSE im Minimalmedium mit verschiedenen Zusätzen

KYSE wurden mit verschiedenen Zusätzen im Minimalmedium über 24 Stunden kultiviert. Die Angabe +/- bzw. ++ bezieht sich darauf, ob Penicillin/Streptomycin enthalten war. Ein + bedeutet, es war enthalten, ein - bedeutet es war nicht enthalten. Das zweite Zeichen nach dem Schrägstrich bedeutet analog dazu, ob 10 % FCS enthalten war oder eben nicht enthalten war. Die Morphologie, Vitalität und Konfluenz der Zellen wurden mittels Lichtmikroskop kontrolliert. Oben links: Zusatz von RPMI +/-, oben mitte: Zusatz von 40 mmol Glutamin, oben rechts: Zusatz von 100 mg/L Glukose, unten links: Zusatz von 200 mg/L Glukose, unten mitte: Zusatz von 500 mg/L Glukose, unten rechts: Zusatz von 1000 mg/L Glukose. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder einer 5-fachen und einer 20-fachen (Bildausschnitt oben links) Vergrößerung. Maßstabsbalken: 500 μm , (n=1).

Im letzten Schritt wurde beobachtet, welche minimale Glukosekonzentration dem MM hinzugesetzt werden konnte, denn es sollte so wenig wie möglich Glukose im MM enthalten sein. Diese minimale Glukosezugabe sollte dafür sorgen, dass sich die KYSE nicht vom Boden der 12-Loch-Platte lösen. Gleichzeitig sollten die KYSE aber auch gehungert werden, sodass diese die später hinzugegebenen FS als Energielieferanten nutzen mussten. Der Zusatz von 50 mg/L Glukose zeigte eine zufriedenstellende Zellvitalität und wurde in den folgenden Versuchen dem MM hinzugefügt. Diese Konzentration definiert in den folgenden Versuchen das MM. Wird im weiteren Text der Begriff MM verwendet, bedeutet dies ab sofort, dass 50 mg/L Glukose dem MM hinzugefügt wurden. Um die Versuche mit den KYSE und NHDF vergleichbar zu halten, wurde auch dem MM der NHDF 50 mg/L Glukose hinzugefügt.

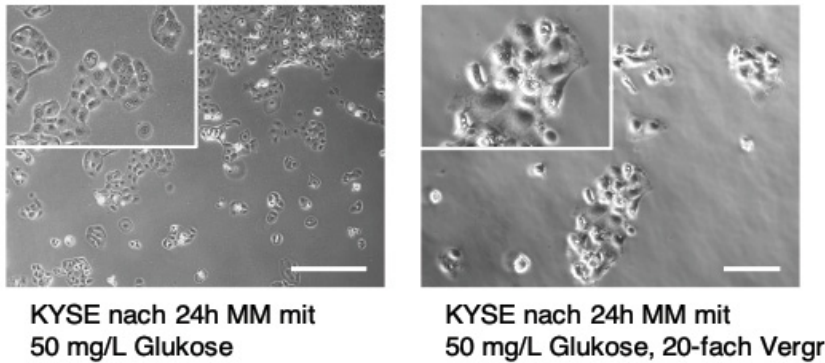


Abbildung 6: Das Überleben von KYSE in Minimalmedium mit 50 mg/L Glukose

KYSE wurden mit 50 mg/L Glukose im Minimalmedium über 24 Stunden kultiviert. Die Morphologie, Vitalität und Konfluenz der Zellen wurden mittels Lichtmikroskop kontrolliert. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder einer 5-fachen (links) und einer 20-fachen Vergrößerung (rechts). Maßstabsbalken: 500 μm (5-fache Vergrößerung) und 100 μm (20-fache Vergrößerung), (n=1).

3.1.2 Etablierung Fettsäurelösung

Für die *In-vitro*-Versuche mussten unpolare FS in polarem Medium mithilfe von einem Lösungsvermittler gelöst werden, damit die FS von den Zellen aufgenommen werden konnten. Im menschlichen Körper werden freie FS von Albumin, dem am höchsten konzentrierten Plasmaprotein im Blut, gebunden und transportiert. Analog dazu wurden im Versuch die FS mit einer Albuminlösung vermischt. Auf diese Weise sollten die KYSE und die NHDF die angebotenen FS aufnehmen können. Folgende FS wurden den Zellen angeboten: Linolsäure (Linol), Ölsäure (Öl), Palmitinsäure (Palm) und die Kombination aus allen drei FS. Dazu wurden zu Beginn die drei FS jeweils in 100%igem Ethanol gelöst. Es entstand eine 200 mM FSL. Diese wurde dann zunächst im Verhältnis 1:40 mit der 12,5%igen fettsäurefreien Albuminlösung verdünnt: Dazu wurden 975 μl der Albuminlösung vorgelegt und 25 μl der entsprechenden FS hinzugegeben. Nach dem Begasen und Schütteln der Probe bei 37 °C für 20 Stunden wurde schließlich an Versuchstag drei (2.2.2) 110 μl der Probe in das MM (Volumen 1 ml) der Zellen gegeben. Die Endkonzentration betrug 0,0125 mM. Bei diesem Versuch konnte sowohl bei den NHDF als auch bei den KYSE keine Zellvitalität unter Stimulation mit der Palmitinsäure nachgewiesen werden (Abbildung 7 (A) und Abbildung 8 (A)).

In einem zweiten Versuch konnte mit einer Verdünnung von 1:20 eine zufriedenstellende Zellvitalität erreicht werden: Dazu wurden 475 μl der Albuminlösung vorgelegt und 25 μl der entsprechenden FS hinzugegeben. In der 12-Loch-Platte mit der Kombination aus allen drei FS wurde erneut darauf geachtet, dass der FS-Anteil insgesamt ebenfalls 25 μl betrug. Nach dem Begasen und Schütteln der Probe bei 37 °C für 20 Stunden wurde schließlich an Versuchstag drei (2.2.2) 55 μl der Probe in das MM (Volumen 1 ml) der Zellen gegeben. Die Endkonzentration betrug 0,025 mM.

Die Zellvitalität bei den KYSE und den NHDF unter diesen Konzentrationen zeigte sich zufriedenstellend.

Durch diese Etablierung der FSL konnte nun der Einfluss der verschiedenen FS auf die KYSE und NHDF in weiteren Experimenten untersucht werden. Bereits in den Aufnahmen des Lichtmikroskops stellte sich heraus, dass die Zellmorphologie der KYSE unter Stimulation mit den FS verändert wurde. Es konnten intrazelluläre Fettsäureablagerungen in Form von „Fettvakuolen“ in den KYSE bereits lichtmikroskopisch erkannt werden (Abbildung 8). Bei den NHDF hatte sich die Morphologie hingegen kaum verändert (Abbildung 7).

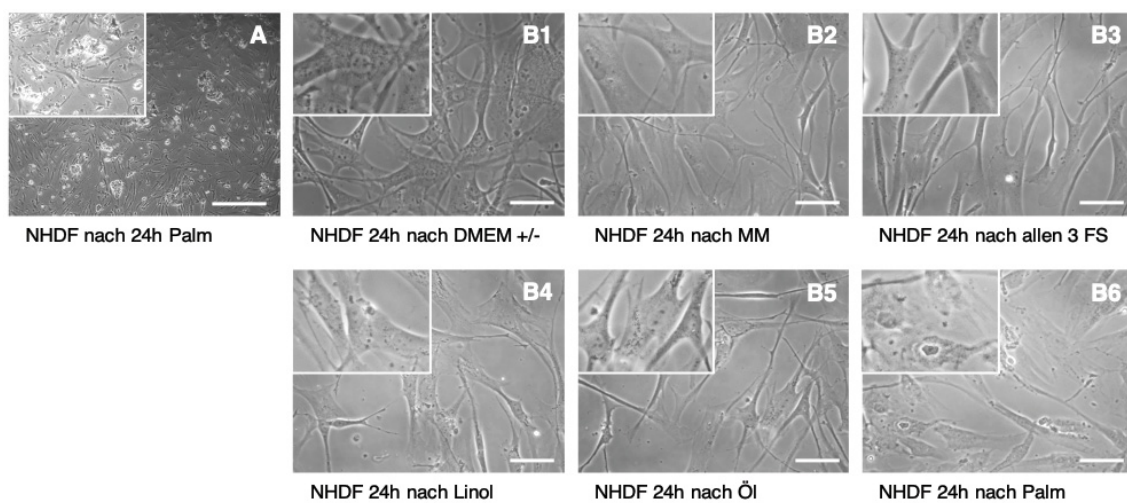


Abbildung 7: Zellvitalität der NHDF während der Etablierung der Fettsäurelösung

Die Morphologie, Vitalität und Konfluenz der Zellen wurden mittels Lichtmikroskop kontrolliert. A: NHDF nach 24 Stunden Inkubation mit der Palmitinsäure (Endkonzentration 0,0125 mM). B: NHDF 24 Stunden nach Inkubation mit der Endkonzentration 0,025 mM: DMEM +/- (B1), Minimalmedium mit 50 mg/L Glukose (B2), alle drei Fettsäuren (B3), Linolsäure (B4), Ölsäure (B5), Palmitinsäure (B6). Die Angabe +/- bzw. +/- bezieht sich darauf, ob Penicillin/Streptomycin enthalten war. Ein + bedeutet, es war enthalten, ein - bedeutet es war nicht enthalten. Das zweite Zeichen nach dem Schrägstrich bedeutet analog dazu, ob 10 % FCS enthalten war oder eben nicht enthalten war. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder einer 5-fachen Vergrößerung (A) sowie einer 40-fachen Vergrößerung (B); Maßstabsbalken: 500 μm (5-fache Vergrößerung), 100 μm (40-fache Vergrößerung), (n=1).

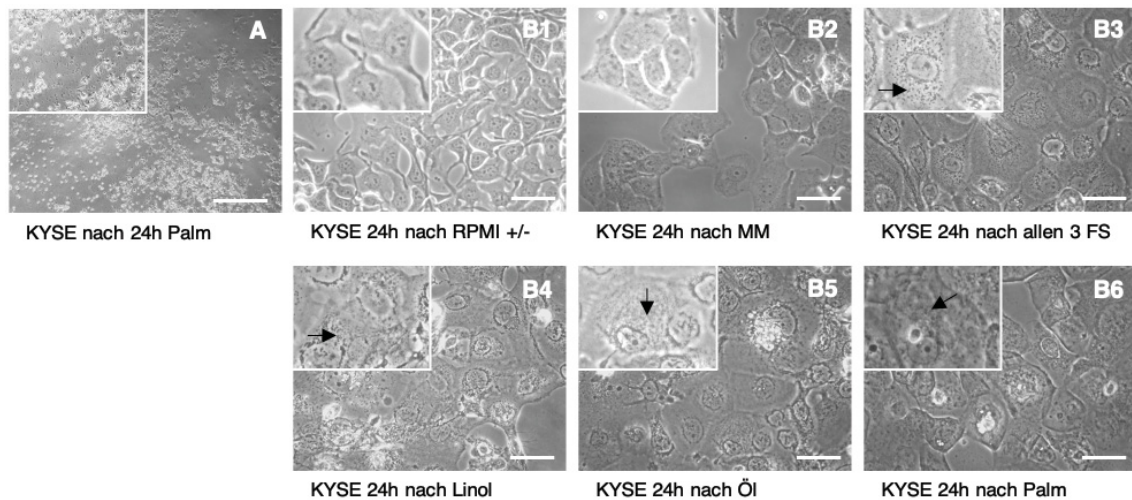


Abbildung 8: Zellvitalität der KYSE während der Etablierung der Fettsäurelösung

Die Morphologie, Vitalität und Konfluenz der Zellen wurden mittels Lichtmikroskop kontrolliert. A: KYSE nach 24 Stunden Inkubation mit der Palmitinsäure (Endkonzentration 0,0125 mM). B: KYSE nach 24 Stunden nach Inkubation mit der Endkonzentration 0,025 mM: RPMI +/- (B1), Minimalmedium mit 50 mg/L Glukose (B2), alle drei Fettsäuren (B3), Linolsäure (B4), Ölsäure (B5), Palmitinsäure (B6). Die Pfeile zeigen exemplarisch auf intrazelluläre Fettsäureansammlungen. Die Angabe +/- bzw. +/- bezieht sich darauf, ob Penicillin/Streptomycin enthalten war. Ein + bedeutet, es war enthalten, ein - bedeutet es war nicht enthalten. Das zweite Zeichen nach dem Schrägstrich bedeutet analog dazu, ob 10 % FCS enthalten war oder eben nicht enthalten war. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder einer 5-fachen Vergrößerung (A) sowie einer 40-fachen Vergrößerung (B); Maßstabsbalken: 500 μm (5-fache Vergrößerung), 100 μm (40-fache Vergrößerung), (n=1).

3.2 Einfluss eines Fettsäureangebotes auf dessen Aufnahme in Tumorzellen und Fibroblasten

Mithilfe der BODIPY-Färbung und deren Farbintensität konnte die Aufnahme von FS in die KYSE und NHDF in der Zellkultur nachgewiesen werden, welches die Grundvoraussetzung für *In-vitro*-Versuche darstellte. In allen *In-vitro*-Versuchen bildeten die Zellen, die mit MM und BSA behandelt wurden, die Kontrolle. Angegeben sind die verschiedenen Bedingungen (MM mit entweder Linol-, Öl-, Palmitinsäure oder allen drei FS), relativ zu der Kontrolle MM mit BSA. Folgendes konnte beobachtet werden: Im Vergleich zur Kontrolle BSA zeigten die NHDF bei allen vier angebotenen FS einen Trend zu einem stärkeren Fettsäuresignal. Lediglich die NHDF, die mit Linolsäure stimuliert wurden, zeigten ein signifikant erhöhtes Fettsäuresignal in den Zellen. Diese wiesen eine um 182 % stärkere Farbsignalintensität auf. Unter den anderen Bedingungen (Öl-, Palmitinsäure und alle drei FS) wurde eine 80%ige Steigerung des Fettsäuresignales beobachtet.

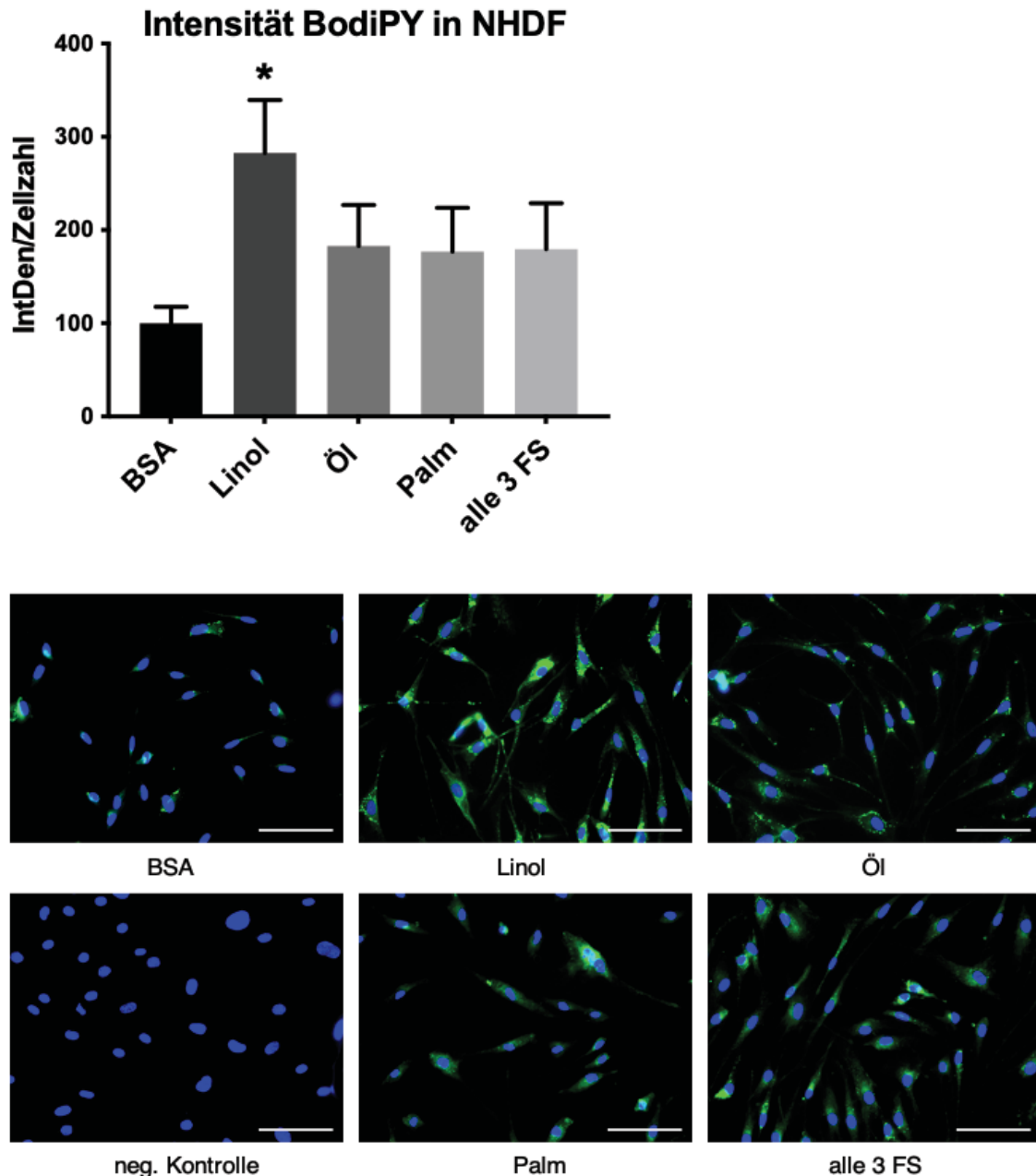


Abbildung 9: NHDF zeigten ein stärkeres Fettsäuresignal nach Stimulation mit Linolsäure
 Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung des Fettsäuregehaltes in NHDF mittels BODIPY-Färbung. Dargestellt sind Zellkerne in Blau (Hoechst), Fette in Grün (BODIPY). Die Intensität wurde zur Zellzahl normalisiert. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder in 20-facher Vergrößerung mit dem inversen Mikroskop; Maßstabsbalken: 100 μm . (n=4). Dargestellt sind MW \pm SEM, one-way ANOVA, Signifikanzen: *, $p < 0,05$.

In den KYSE hingegen konnte ein erhöhtes Fettsäuresignal bei allen angebotenen FS nachgewiesen werden. Es zeigte sich die stärkste Farbintensität, wenn die KYSE eine Mischung aus allen drei FS erhalten haben. Hierbei zeigte sich eine 332%ige Erhöhung des Fettsäuresignales in den KYSE verglichen zur Kontrolle. Die Stimulation mit Linolsäure bewirkte eine Erhöhung des Fettsäuresignales von 231 %, Ölsäure eine Erhöhung von 203 % und Palmitinsäure eine Erhöhung von 216 %.

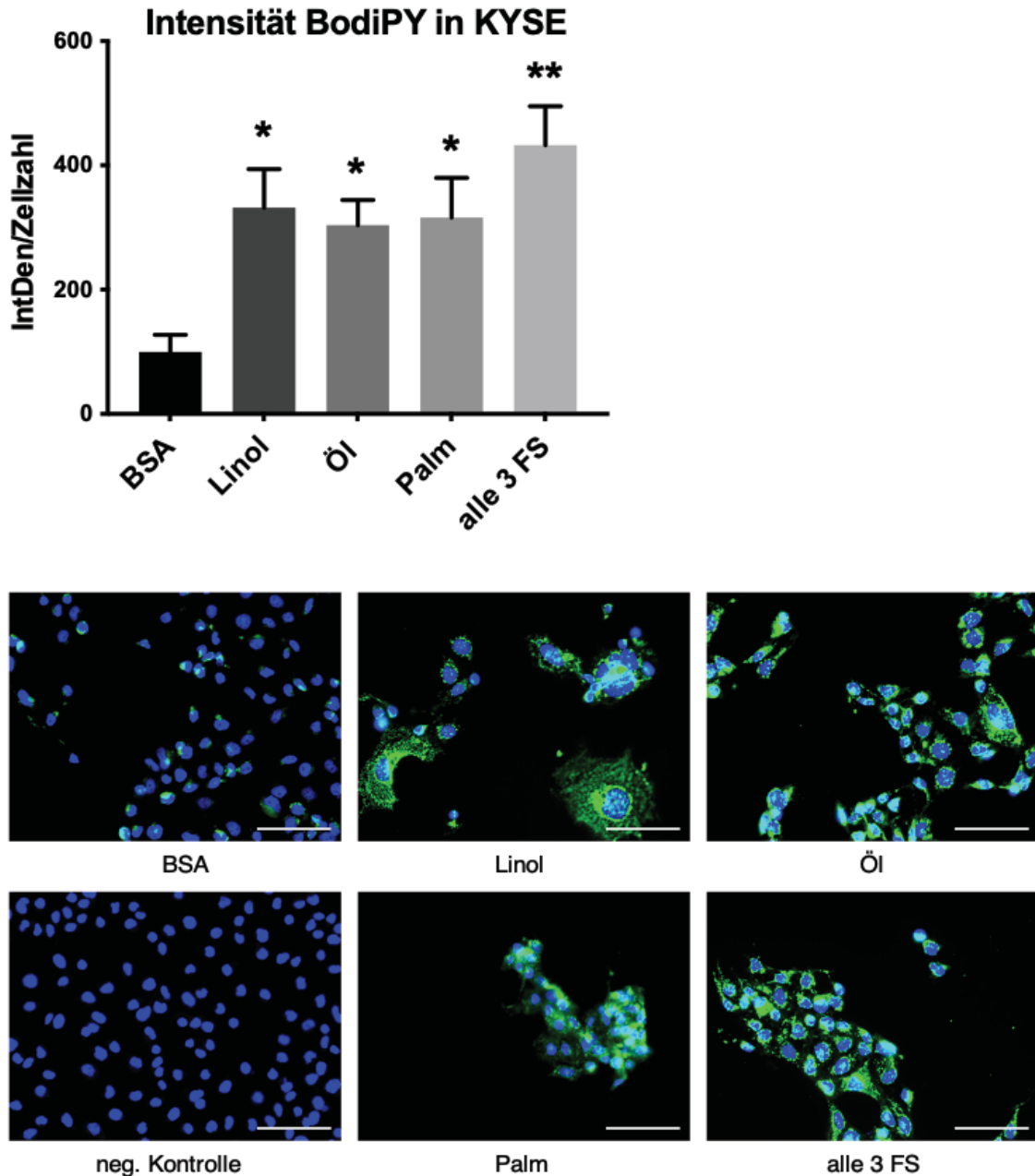


Abbildung 10: KYSE zeigten ein stärkeres Fettsäuresignal nach Stimulation mit verschiedenen Fettsäuren

Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung des Fettsäuregehaltes in KYSE mittels BODIPY-Färbung. Zellkerne in Blau (Hoechst), Fette in Grün (BODIPY). Die Intensität wurde zur Zellzahl normalisiert. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder in 20-facher Vergrößerung mit dem inversen Mikroskop; Maßstabsbalken: 100 μm . (n=5). Dargestellt sind MW \pm SEM, one-way ANOVA, Signifikanzen: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,001$.

3.3 Einfluss von Fettsäuren auf die Hyaluronsäure-Synthese *in vitro*

Im Anschluss wurde der Einfluss eines erhöhten Fettsäureangebotes auf den Hyaluronsäurehaushalt sowohl in den NHDF als auch in den KYSE analysiert. Eine der zentralen Fragestellungen dieser Dissertation war es herauszufinden, ob ein erhöhtes Angebot an FS einen Einfluss auf den Hyaluronsäurehaushalt nimmt.

3.3.1 HABP-Immunaффinitäts-Assay

Grundlegend für die Hyaluronsäure-Quantifizierung war die Frage, ob Tumorzellen und Fibroblasten die Eigenschaft haben, aus Fetten HA zu synthetisieren. Dazu wurde mit dem HABP-Affinitäts-Assay der Einfluss von verschiedenen FS auf die Hyaluronsäuresynthese in KYSE und NHDF gemessen.

Betrachtet man die Hyaluronsäuresynthese der NHDF abhängig von den verschiedenen FS, so konnte keine vermehrte Synthese detektiert werden. Die KYSE hingegen zeigten sowohl bei den einzeln angebotenen FS als auch bei der Kombination aus allen drei FS, eine Verdopplung des Hyaluronsäuregehaltes im Vergleich zur Kontrolle.

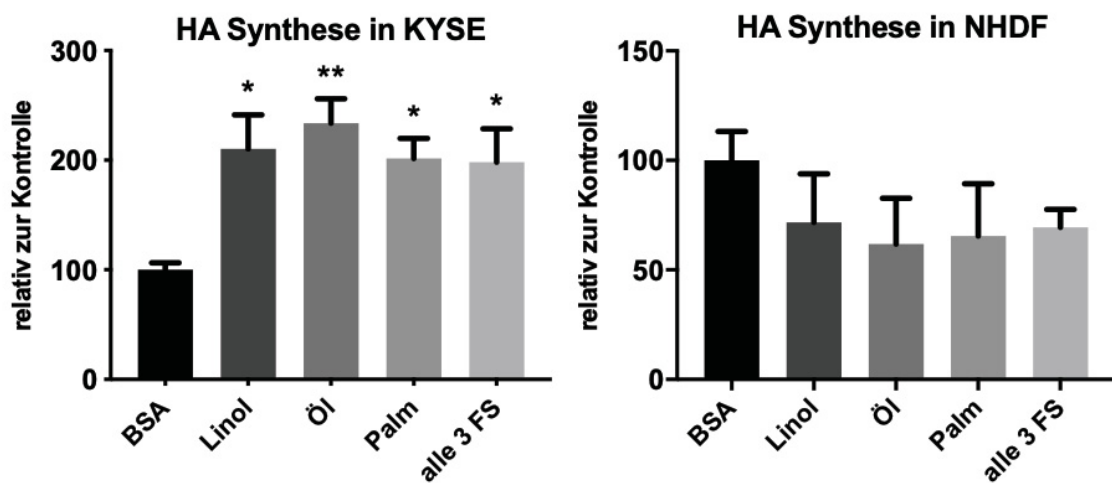


Abbildung 11: Steigerung der Hyaluronsäure-Konzentration in Zellkulturüberständen von KYSE durch das Angebot von Fettsäuren

Hyaluronsäurekonzentration wurde im Überstand der KYSE und NHDF mittels ELISA-ähnlicher Immunaффinitätsmessung nach Stimulation mit verschiedenen Fettsäuren gemessen. (NHDF: n=3, KYSE: n=4). MW ± SEM, one-way ANOVA, Signifikanzen: *, p < 0,05; **, p < 0,005.

3.3.2 Hyaluronsäurebindeprotein-Färbung

Zum Nachweis eines veränderten perizellulären Hyaluronsäuregehalts unter einer Stimulation mit verschiedenen FS wurde HA mithilfe einer Affinitätsfärbung auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Bei den NHDF zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Synthese von HA unter Fettsäurestimulation, es ließen sich lediglich folgende Trends beobachten: Linolsäure bewirkte eine Erhöhung des Hyaluronsäuresignales von 40 %, Ölsäure eine Steigerung von 66 %, Palmitinsäure eine Steigerung von 36 % und alle drei FS kombiniert bewirkten eine Erhöhung des Hyaluronsäuresignales von 71 %.

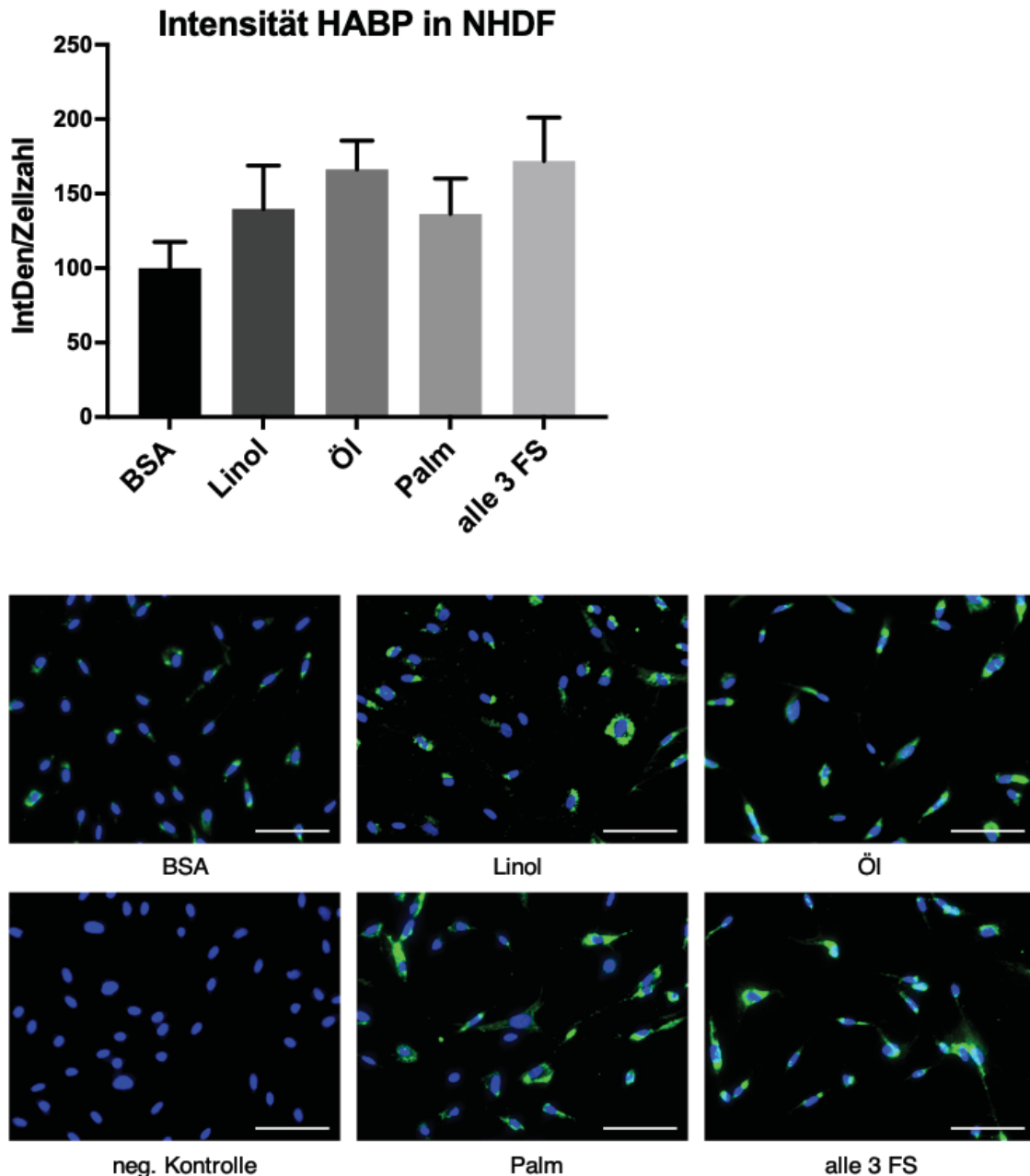


Abbildung 12: Keine signifikante Steigerung der perizellulären Hyaluronsäure-Signalintensität durch Fettsäure-Stimulation in den NHDF

Fluoreszenzmikroskopische Hyaluronsäurequantifizierung in der perizellulären Matrix der NHDF mittels HABP-Färbung. Zellkerne in Blau (Hoechst), HA in Grün (FITC). Die Intensität wurde zur Zellzahl normalisiert. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder in 20-facher Vergrößerung mit dem inversen Mikroskop; Maßstabsbalken: 100 μm . (n=5). Dargestellt sind MW \pm SEM, one-way ANOVA.

Betrachtet man hingegen die Signalintensität von HA unter Fettsäurestimulation in den KYSE, so konnte gezeigt werden, dass FS einen signifikant erhöhten perizellulären Hyaluronsäuregehalt bewirken. Linolsäure und die Kombination von allen drei FS bewirkte eine Verdopplung des Hyaluronsäuresignales im Vergleich zur Kontrolle. Palmitinsäure bewirkte eine signifikante Steigerung des Hyaluronsäuresignales um 88

%). Unter Ölsäure konnte ebenfalls ein Trend zur erhöhten Hyaluronsäurefarbintensität um 74 % abgeleitet werden.

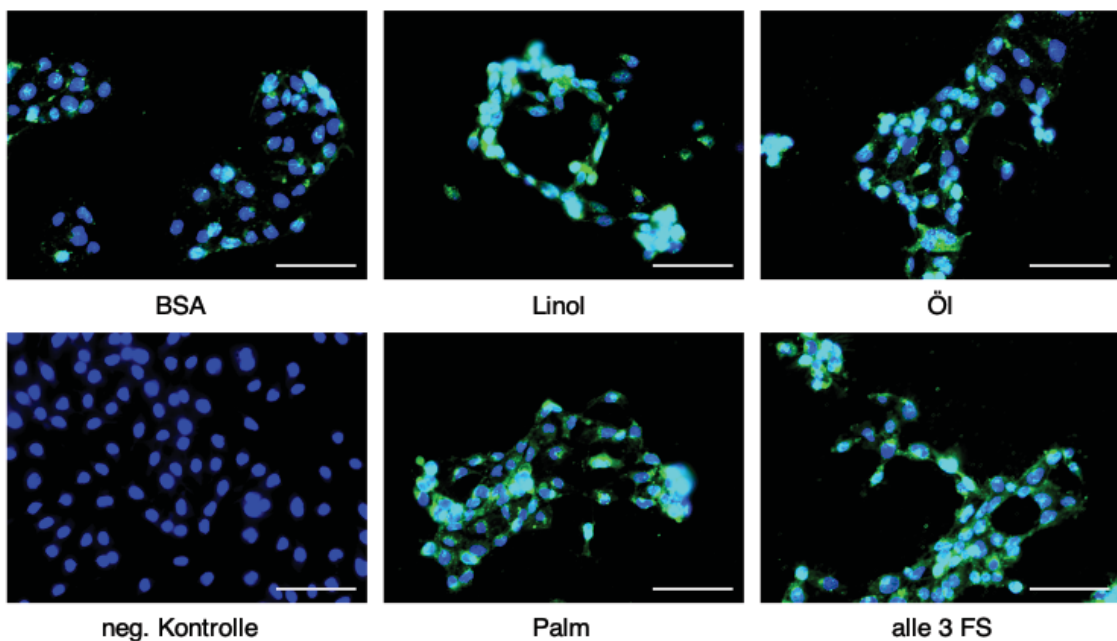
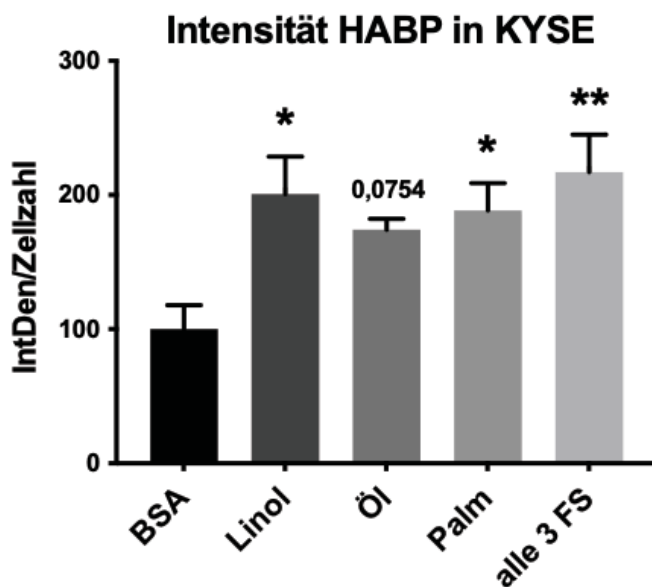


Abbildung 13: Steigerung der perizellulären Hyaluronsäure-Farbintensität in KYSE unter Stimulation mit Fettsäuren

Fluoreszenzmikroskopische Hyaluronsäurequantifizierung in der perizellulären Matrix der KYSE mittels HABP-Färbung. Zellkerne in Blau (Hoechst), Hyaluronsäure in Grün (FITC). Die Intensität wurde zur Zellzahl normalisiert. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder in 20-facher Vergrößerung mit dem inversen Mikroskop; Maßstabsbalken: 100 μm . (n=6). Dargestellt sind MW \pm SEM, one-way ANOVA, Signifikanzen: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$.

3.4 Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf das Tumervolumen *in vivo* im Nacktmaus Xenograft Modell

Eine wichtige Voraussetzung für den *In-vivo*-Versuch war die Gewichtsverteilung der Mäuse zwischen den verschiedenen Gruppen. Ein verändertes TV durfte nicht durch die andere Ernährungsweise und das generelle Körpergewicht der Mäuse verzerrt werden. Des Weiteren haben die drei Versuchsgruppen zwar verschiedenes Futter erhalten, jedoch war der Energiegehalt identisch. Es zeigte sich im Versuch eine homogene Gewichtsverteilung zwischen den drei Gruppen (KON-, FETT-, CHO-Gruppe). Das Startgewicht der Mäuse betrug im Durchschnitt 31 g und wurden dreimal in der Woche gemessen. An Tag 16 wurde zum ersten Mal das TV bestimmt und das Gewicht der FETT- und KON-Gruppe betrug im Durchschnitt 34,5 g, das der CHO-Gruppe 34 g. Am Tag 33 wurde die erste Maus der KON-Gruppe aus dem Versuch genommen, da der Tumor eine Kantenlänge von 15 mm überschritten hatte. Auch zu diesem Zeitpunkt waren die Körpergewichte der Mäuse ähnlich. Die KON-Gruppe hatte ein Durchschnittsgewicht von 35,5 g, die FETT-Gruppe eins von 36 g und die CHO-Gruppe wog im Durchschnitt 36,5 g. In jeder Gruppe kam es zu einer stetigen Gewichtszunahme.

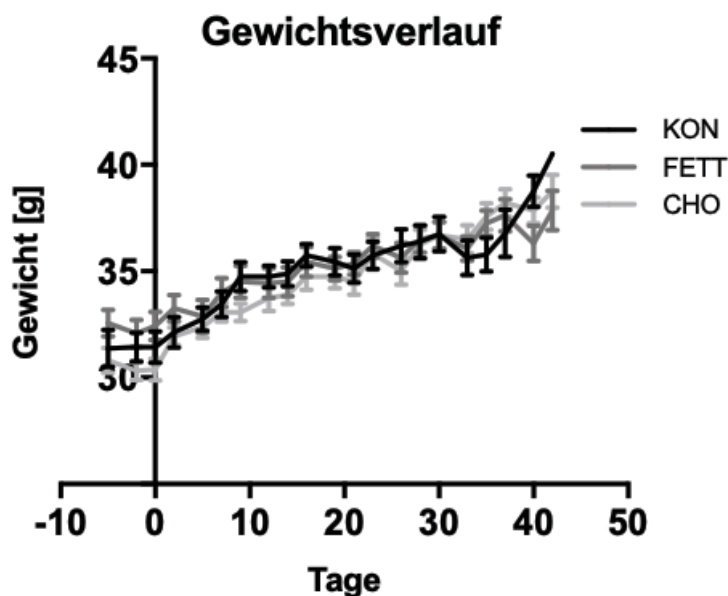


Abbildung 14: Homogene Gewichtsverteilung der Nacktmäuse zwischen den drei Versuchsgruppen

Graphische Darstellung des Durchschnittsgewichtes der acht Mäuse jeder Versuchsgruppe (KON-, FETT-, CHO-Gruppe) über den Versuchszeitraum (Tag -5 bis Tag 42). Die Mäuse jeder Gruppe wurden von Versuchsbeginn bis zum Versuchsende dreimal wöchentlich gewogen. Die Mäuse bekamen je nach Versuchsgruppe entweder ein Futter mit erhöhtem Fettgehalt (FETT-Gruppe), ein Futter mit erhöhtem Zuckergehalt (CHO-Gruppe) oder ein ausgewogenes Futter (KON-Gruppe). Der Energiegehalt pro Gramm Futter war jedoch identisch, sodass jede Maus durch das Futter gleich viele Kalorien aufgenommen hat. Lediglich die Zusammensetzung der Nährstoffe war verschieden. (n=24). Dargestellt sind MW \pm SEM, one-way ANOVA.

Ab Tag 16 wurde ebenfalls, wie in 2.4.2 beschrieben, dreimal pro Woche das TV gemessen. Zu Beginn des Versuches waren die Tumorumfänge besonders zwischen der CHO- und der FETT-Gruppe annähernd gleich. In den ersten Tagen (Tag 16 bis Tag 33) zeigte sich der folgende Trend: Die KON-Gruppe zeigte von Beginn an das schnellste Tumorstadium. Die beiden anderen Gruppen zeigten nahezu das gleiche Tumorstadium. An Tag 33 betrug der MW des TV der KON-Gruppe 416,4 mm³, der MW der FETT-Gruppe betrug 251,3 mm³ und der MW der CHO-Gruppe betrug 250,6 mm³. In den folgenden Tagen bestätigte sich der Trend: Die KON-Gruppe zeigte fortan das schnellste Tumorstadium. Interessanterweise trennte sich jedoch die FETT-Gruppe von der CHO-Gruppe mit dem langsamsten Tumorstadium. An Tag 42 hatten alle Tumore der KON-Gruppe den Grenzwert überschritten. Die anderen beiden Gruppen brauchten noch weitere 16 Tage, bis alle Tumore die maximale Kantenlänge erreicht hatten. Zudem ist zu erwähnen, dass eine Maus aus der CHO-Gruppe auf beiden Seiten keinen Tumor entwickelt hat. In Abbildung 15 wurde das TV der Mäuse an Tag 42 verglichen. Der MW des TV der KON-Gruppe betrug zu diesem Zeitpunkt 630,65 mm³, der MW der FETT-Gruppe zeigte ein TV von 479,26 mm³ und der MW der CHO-Gruppe betrug zu diesem Zeitpunkt 328,59 mm³. Es konnte ein signifikant verschiedenes TV zwischen den drei Gruppen gemessen werden: Die KON-Gruppe zeigte von allen drei Gruppen das schnellste Tumorstadium und die FETT-Gruppe zeigte ein schnelleres Tumorstadium als die CHO-Gruppe.

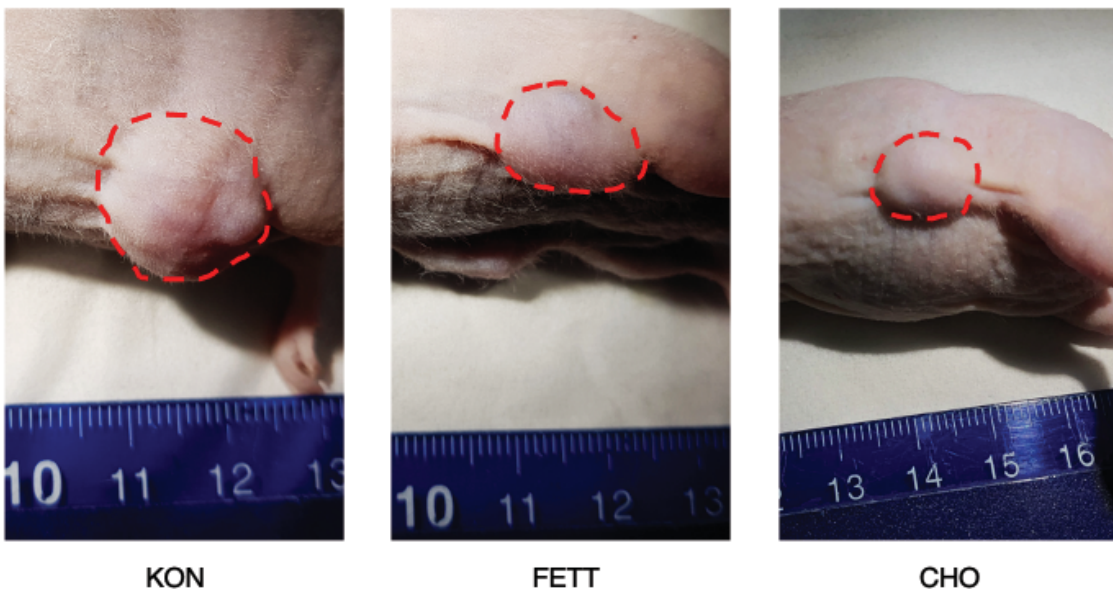
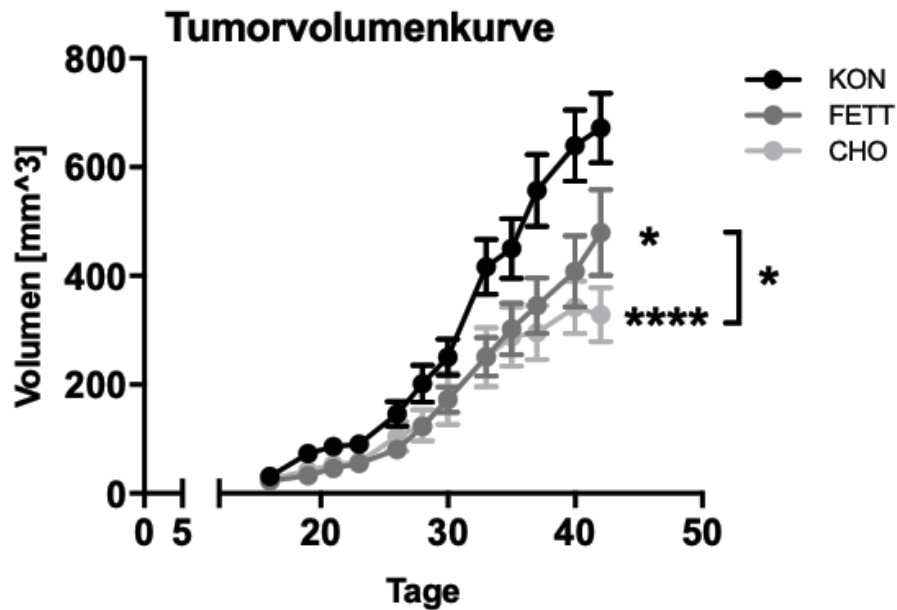


Abbildung 15: Signifikant verschiedenes Tumorvolumen zwischen den drei Versuchsgruppen über den Versuchszeitraum

Dargestellt ist das TV in mm³ der verschiedenen Gruppen (KON-, FETT-, CHO-Gruppe) von Versuchstag 16 bis 42. An Tag 16 wurde das TV zum ersten Mal erhoben. Die Messung des Tumorzvolumens erfolgte dreimalwöchentlich mit einem digitalen Messschieber. Die statistische Auswertung erfolgte an Tag 42, da zu diesem Zeitpunkt alle acht Mäuse der KON-Gruppe die maximale Tumorkantenlänge von 15 mm überschritten hatten. (n=46). Die Bilder veranschaulichen repräsentativ die beidseitig subkutan injizierten Tumore am Tag der Tumorentnahme. Dargestellt sind MW ± SEM, one-way ANOVA. Signifikanzen: *, p < 0,05; ****, p < 0,0001.

3.5 Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Fettaufnahme *in vivo*

Anhand der immunhistochemischen BODIPY-Färbungen der Kryoschnitte kann in Abbildung 16 gezeigt werden, welchen Einfluss die verschiedenen Futtersorten auf die Fettsäuresignalintensität im Tumorgewebe hatten. Dieser Versuch konnte zeigen, dass die Fette aus dem Futter letztendlich auch im Tumor nachgewiesen werden konnten. Die Kryoschnitte aus der FETT-Gruppe zeigten sowohl im Tumor als auch im Stroma ein signifikant stärkeres BODIPY Signal als die CHO-Gruppe. Die Signalintensität in den Tumorzellen war bei der FETT-Gruppe mit 66,19 % signifikant höher als in der CHO-Gruppe. Auch im Stroma zeigte die FETT-Gruppe ein um 57,91 % stärkeres Fettsäuresignal als die CHO-Gruppe. Das Tumorgewebe zeigte verglichen mit dem Stroma generell, unabhängig von der Versuchsgruppe, eine deutlich stärkere Fettsäuresignalintensität.

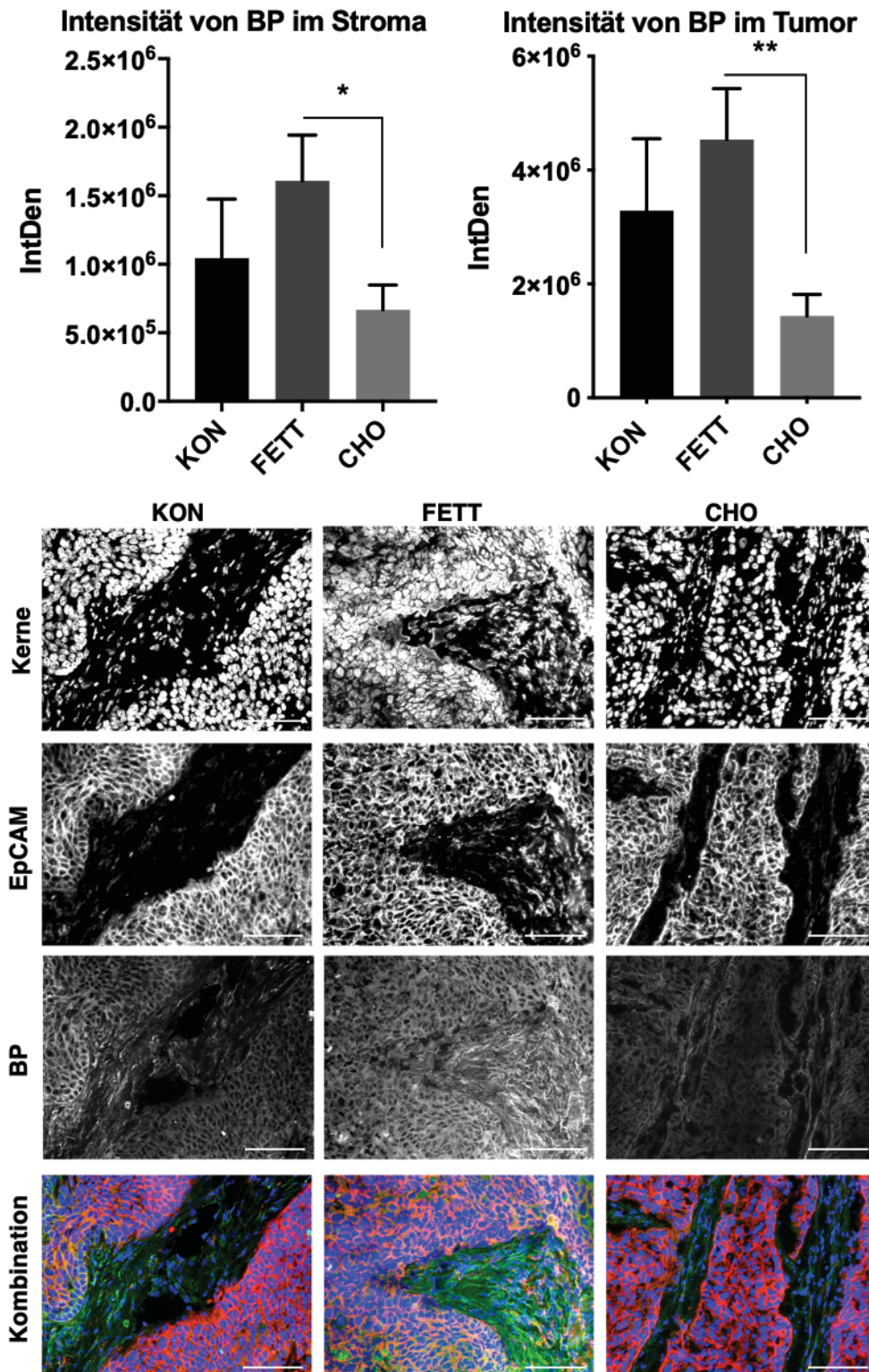


Abbildung 16: Gesteigerte Fettsäure-Signalintensität sowohl im Tumorgewebe als auch im Stroma unter einer fettreichen Diät

Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung des Fettsäuregehaltes der drei Versuchsgruppen im Tumorgewebe und im Stroma an Hand der BODIPY-Färbung. Dargestellt sind die Einzelkanalbilder in schwarz/weiß jeweils von den Zellkernen (Kerne), vom Tumorgewebe (EpCAM) und vom Fett (BP). Die Kombination zeigt Zellkerne in Blau, Tumorgewebe in Rot und Fett in Grün. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder in 10-facher Vergrößerung mit dem inversen Mikroskop; Maßstabsbalken: $100 \mu\text{m}$. (KON $n=13-15$, FETT $n=27-30$, CHO $n=27-30$). Dargestellt sind MW \pm SEM, one-way ANOVA, Signifikanzen: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$.

3.6 Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Hyaluronsäure-Synthese *in vivo*

Um mögliche Ursachen und Erklärungen für das unterschiedliche Tumorstadium in den drei Versuchsgruppen zu definieren, wurde der Einfluss der unterschiedlichen Ernährung auf die Hyaluronsäuremenge analysiert. Mithilfe der HAP-Färbung stellte sich heraus, dass in den Tumorzellen ein um 46,29 % signifikant stärkeres Farbsignal gemessen werden konnte, wenn sie eine fettreiche Diät erhalten hatten, verglichen mit der CHO-Gruppe. Vergleicht man die FETT-Gruppe mit der Kontrollgruppe, so konnte ein um 41,79 % höheres Hyaluronsäuresignal des Tumors in der FETT-Gruppe beobachtet werden. Im Stroma zeigte sich kein Unterschied bei den Hyaluronsäuresignalintensitäten zwischen der FETT- und CHO-Gruppe. Generell konnte im Tumor ein deutlich stärkeres Hyaluronsäuresignal gemessen werden, verglichen mit dem Stroma.

Intensität von HA im Stroma und Tumor

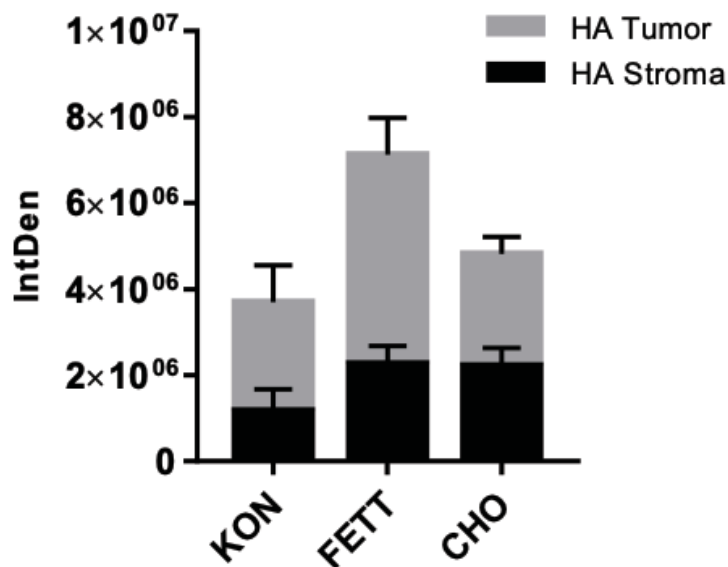


Abbildung 17: Stärkere Hyaluronsäure-Signalintensität im Tumorgewebe als im Stroma

Gestapelte Darstellung der Hyaluronsäurefarbintensität im Stroma und im Tumorgewebe in den drei Versuchsgruppen. Quantifizierung mittels HAP-Färbung. (KON n=13-15, FETT n= 27-30, CHO n= 27-30). Dargestellt sind MW ± SEM, one-way ANOVA.

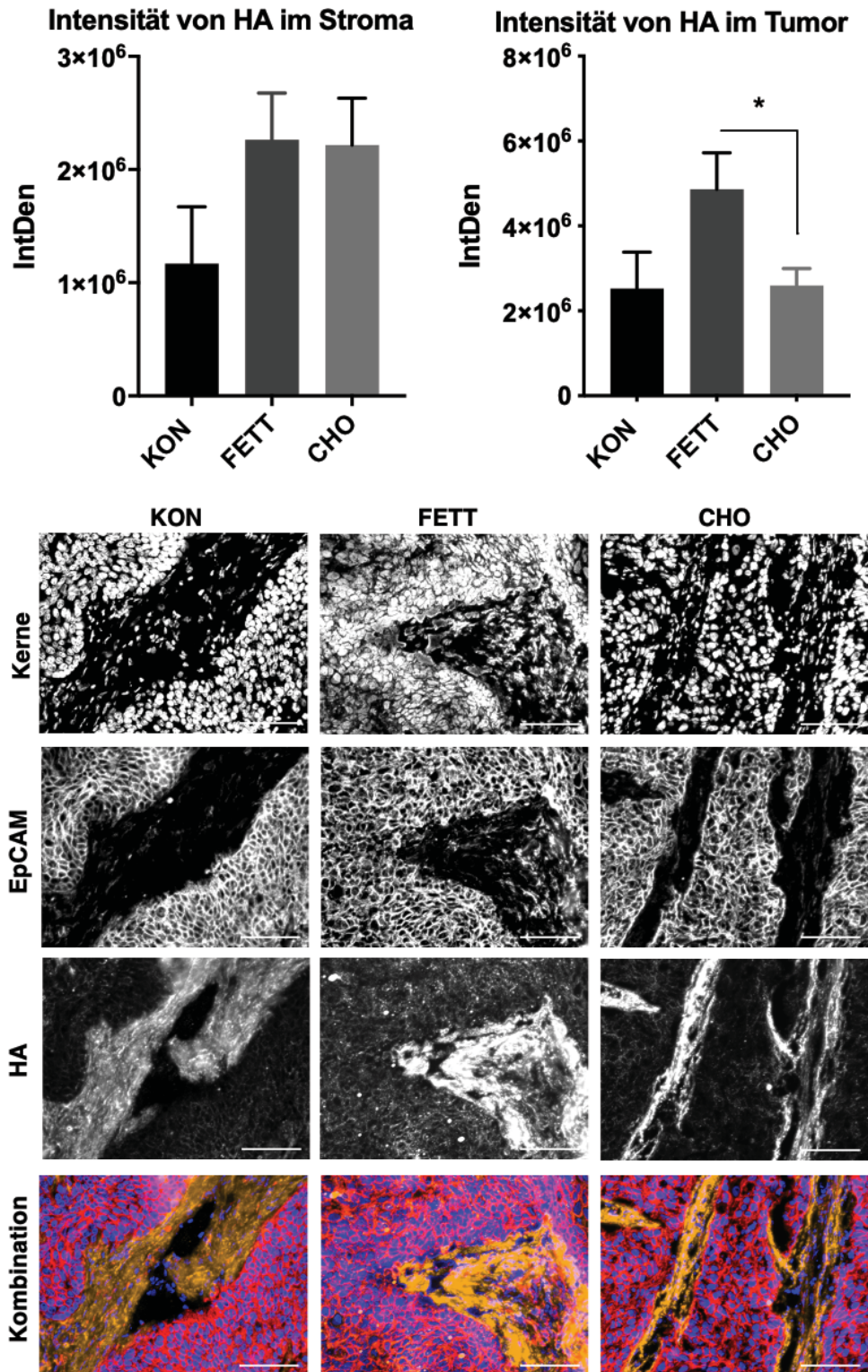


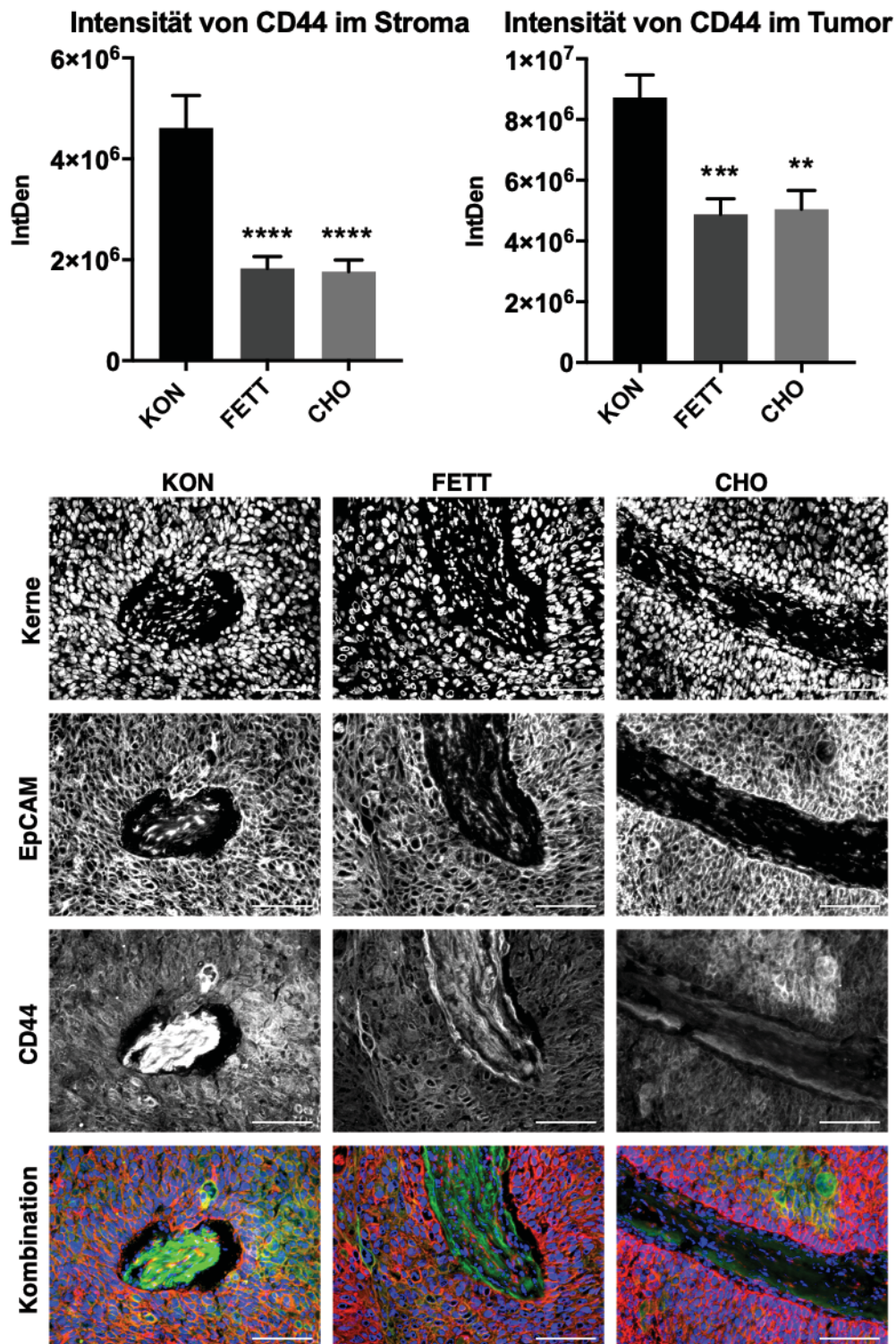
Abbildung 18: Gesteigerte Hyaluronsäure-Signalintensität in den Tumoren der Fettgruppe

Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung des Hyaluronsäuregehaltes der drei Versuchsgruppen im Tumorgewebe und im Stroma an Hand der HAP-Färbung. Dargestellt sind die Einzelkanalbilder in schwarz/weiß jeweils von den Zellkernen (Kerne), vom Tumorgewebe (EpCAM) und von der Hyaluronsäure. Die Kombination zeigt Zellkerne in Blau, Tumorgewebe in Rot und Hyaluronsäure in Orange. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Bilder in 10-facher Vergrößerung mit dem inversen Mikroskop; Maßstabsbalken: 100 μm . (KON n=10-11, FETT n=30-34, CHO n=28-30). Dargestellt sind MW \pm SEM, one-way ANOVA, Signifikanzen: *, p < 0,05.

3.7 Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Expression von CD44 *in vivo*

Ebenfalls von Interesse war die Dichte des Hyaluronsäurerezeptors CD44 und dessen Expressionslokalisation. Wie bereits in 1.2.4 erwähnt, ist CD44 als Rezeptor für intrazelluläre Signalkaskaden von entscheidender Bedeutung. Über die Aktivierung dieses Rezeptors werden tumorsupportive Mechanismen wie Progression, Migration und Invasion gefördert.

Es konnte mit der Färbung des CD44-Rezeptors beobachtet werden, dass die Signalintensität von CD44 generell in der KON-Gruppe höher war. Im Stroma der KON-Gruppe zeigte sich eine um 62,19 % höhere CD44-Signalintensität im Vergleich zur CHO-Gruppe. Vergleicht man im Stroma die KON-Gruppe mit der FETT- Gruppe, so konnte auch hier in der KON-Gruppe eine um 57,95 % höhere Farbintensität beobachtet werden. Betrachtet man die Tumorzellen, so zeigte die KON-Gruppe eine um ca. 34 % stärkere CD44-Intensität als die FETT- und die CHO-Gruppe. Auch in dieser Färbung zeigte sich die CD44-Signalintensität im Tumor generell höher als im Stroma (Abbildung 19).



4 Diskussion

Ist es nun möglich, die Hyaluronsäuresynthese durch ein erhöhtes Fettsäureangebot zu steigern und wenn ja durch welche Mechanismen könnte diese Beobachtung erklärt werden?

Diese zentrale Fragestellung (1.4) bildet die Grundlage der experimentell durchgeführten Versuche, welche den Zusammenhang zwischen dem Fettsäuremetabolismus und der Hyaluronsäureproduktion untersuchten. Des Weiteren wurde die Auswirkung einer kohlenhydrat- oder fettreichen Diät auf das Tumorwachstum und die Hyaluronsäurematrix im Xenograft-Nacktmausmodell untersucht.

HA als wichtiger Faktor in der Tumorentstehung fördert die Invasion (17), Angiogenese (19), Metastasierung (21) und Chemotherapieresistenz (22) der Tumorzellen. Aber auch der Fettsäuremetabolismus nimmt, wie bereits in 1.3 beschrieben, eine immer bedeutendere Rolle in der Tumorforschung ein: Tumorzellen zeigen unter anderem eine erhöhte Expression von Enzymen, welche an der *de-novo* Fettsäuresynthese beteiligt sind (60). Des Weiteren benötigen Tumorzellen FS in erhöhtem Maße für die Zellproliferation (61) und eine erhöhte Expression der Fettsäuresynthase ist in Tumorzellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert (61).

Auf der Grundlage der durchgeführten Experimente kann die zentrale Fragestellung nun beantwortet werden: Es scheint in Tumorzellen Stoffwechselfähigkeiten zu geben, in denen die Hyaluronsäuresynthese durch ein erhöhtes Fettsäureangebot gesteigert werden kann.

In der Literatur sind ähnliche Beobachtung nicht beschrieben. Des Weiteren konnte in den *In-vivo*-Versuchen gezeigt werden, dass das TV unter einer fettreichen Diät schneller zunimmt als unter einer kohlenhydratreichen Diät.

4.1 Einfluss des etablierten Minimalmediums auf das Überleben der Tumorzellen

Während der Etablierung des MM zeigte sich, dass die Tumorzellen ohne den Zusatz von 50 mg/L Glukose nicht kultiviert werden konnten (siehe 3.1.1). Diese Beobachtung unterstreicht den Warburg-Effekt. Fibroblasten hingegen benötigten keinen Nährstoffzusatz für die Hungerzeit von 24 Stunden. Diese Tatsache verdeutlicht den gesteigerten und veränderten Metabolismus in entarteten Zellen. Otto Warburg beschrieb in den 1920er-Jahren die ersten Stoffwechseleränderungen in den Tumorzellen (57). Aber auch der tägliche klinische Einsatz von Positronen-Emissions-

Tomografien mit der Verwendung von Glukoseanaloga, welche sich in stoffwechselaktivem Tumorgewebe anreichern und somit tumoraktives Gewebe detektieren, unterstreichen den erhöhten Bedarf an Glukose in entarteten Zellen. Dementsprechend weisen die Krebszellen beispielsweise eine hochregulierte Expression von Glukosetransportern (GLUT) wie GLUT-1 und GLUT-3 auf, sodass eine größere Glukosemenge aufgenommen werden kann (71). Mutationen bewirken Verluste von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von Onkogenen, wodurch die Zellteilung und der Stoffwechsel in Tumorzellen hochreguliert wird. Für den erhöhten Stoffwechsel ist mehr Energie in Form von ATP nötig. Dies kann durch einen erhöhten Glukose-Umsatz im Rahmen des Warburg-Effekts erfolgen oder alternativ durch eine gesteigerte Lipolyse; ein FS-Molekül weist einen erhöhten Energieinhalt im Vergleich zur Glukose auf (71). Das Ablösen der KYSE vom Boden der 12-Loch-Platte in einem MM ohne den Zusatz von Glukose kann folglich gut erklärt werden. Ebenfalls zeigte sich bei der Kultivierung mit einem reduzierten Glukosegehalt lediglich ein Überleben der KYSE und keine Zellproliferation. Unter Zugabe von RPMI, dem Vollmedium, welches 2 g/L Glukose enthielt, konnte eine Zellproliferation und somit eine Vermehrung der KYSE beobachtet werden. Dieses Ergebnis war von besonderer Bedeutung, da so die Grundlage der weiteren *In-vitro*-Versuche gebildet werden konnte. Die Zellen wurden für 24 Stunden „gehungert“, sodass am nächsten Versuchstag möglichst viele der angebotenen FS als Substrat für den Metabolismus der Zellen aufgenommen wurden.

Die alleinige Supplementation der Aminosäure Glutamin im MM zeigte ein Ablösen der KYSE von dem Boden der 12-Loch-Platte. Keenan und Chi (72) beschrieben, dass auch Glutamin einige wichtige Stoffwechselrollen in Tumorzellen einnimmt. Glutamin kann als Kohlenstoffquelle der Energiegewinnung dienen, als Stickstoffquelle kann es die Nukleinsäuresynthese fördern und Glutamin ist bei der Erhaltung der Redox-Homöostase von entscheidender Bedeutung. Jedoch scheinen die KYSE deutlich stärker auf die Glukose angewiesen zu sein und können den Stoffwechsel unter Glutamin alleine nicht aufrecht halten.

4.2 Einfluss der Fettsäurelösung auf die Tumorzellen

Fette haben hydrophobe und unpolare Eigenschaften, sodass sich die Fette kaum wasserlöslich zeigen (65). Als Lösungsvermittler werden daher unpolare, organische Lösungsmittel verwendet. Die Problematik der Löslichkeit der FS in den *in vitro* Experimenten konnte mithilfe von Ethanol, einem organischen, unpolarem Lösungsmittel und mithilfe der Erwärmung erreicht werden (69). Die Fette konnten dann an eine fettsäurefreie Albuminlösung gebunden und den kultivierten Zellen angeboten werden.

Tumorzellen nehmen die Lipide unter anderem exogen über die Zellmembran auf. Dazu werden spezielle Transporter wie beispielsweise CD36 benötigt (73). Es gibt Hinweise, dass eine erhöhte CD36-Expression in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen die Aggressivität dieser Tumorentität erhöht (74). Eine Auswirkung erhöhter exogener Fettsäureaufnahme ist die anschließende Speicherung in Lipidtröpfchen. Lipidtröpfchen sind zytoplasmatische Organellen, welche die Fette sequestrieren (73). Die in Abbildung 8 beobachteten intrazellulären Fettsäureansammlungen, welche sich lichtmikroskopisch nach Inkubation mit den FS in den KYSE zeigten, könnten gerade diese beschriebenen Lipidtröpfchen darstellen. Sie dienen der Aufrechterhaltung der Lipidhomöostase und können den Tumorzellen Energie in Form von ATP und NADPH in metabolischen Stressituationen liefern (73).

4.3 Einfluss der Nährstoffe auf die FS Aufnahme *in vitro* und *in vivo*

4.3.1 Korrelation des Fettsäureangebotes mit der Fettsäureaufnahme *in vitro* in Tumorzellen und Fibroblasten

In den *In-vitro*-Versuchen wurde ein Zusammenhang zwischen Fettsäureangebot und der peri- und extrazelluläre Hyaluronsäurekonzentration untersucht. Ziel war es, herauszufinden, ob die FS, welche den Zellen angeboten wurden, eine Auswirkung auf die Menge der synthetisierten HA genommen hat. Für die Interpretation ist es von Bedeutung, dass die hinzugegebenen FS auch tatsächlich von den Zellen aufgenommen werden konnten. Dies konnte mit der intrazellulären Lipidfärbung BODIPY (3.2) bestätigt werden.

Es existieren verschiedene Methoden zur Bestimmung der Fettsäureaufnahme *in vitro* (75). Bereits Mc Arthur et al. (76) konnte zeigen, dass die zelluläre Aufnahme von langkettigen FS durch mehrere miteinander interagierende Mechanismen reguliert wird: zum einen durch die Löslichkeit der FS, durch diffusions- und proteinvermittelte Translokationen der FS über die Zellmembran, durch die zytoplasmatische Bindung der FS intrazellulär, aber auch durch die Aktivität der Fettsäuresynthase. Schürer et al. (77) untersuchten die Aufnahme von Linolsäure und Ölsäure in kultivierten humanen Keratinozyten und verglichen diese unter anderem mit der Aufnahme der FS in dermalen Fibroblasten. Keratinozyten konnten im Vergleich zu Fibroblasten vor allem in den ersten Sekunden nach Hinzugabe der zweifach ungesättigten Linolsäure diese schneller aufnehmen als die einfach ungesättigte Ölsäure. Sie postulierten daher, die Existenz eines Keratinozyten-Fettsäuretransporter, der eine höhere Affinität für Linolsäure aufweist. Die Fettsäureaufnahme in Fibroblasten hingegen erfolgt eher mittels passiver

Diffusion und braucht folglich eine längere Zeit (77). In den oben durchgeführten Versuchen wurden die NHDF und KYSE über 24 Stunden mit den FS inkubiert. Bei den NHDF zeigte sich lediglich eine signifikant vermehrte Farbtintensität bei der Aufnahme von Linolsäure (Abbildung 9). Linolsäure als essentielle FS, kann nicht durch die Zellen selbst hergestellt werden. Folglich könnte ein Linolsäureangebot über einen längeren Zeitraum dazu führen, dass die NHDF diese FS signifikant stärker über passive Diffusion aufnehmen als die anderen angebotenen FS, zumal Linolsäure eine essentielle FS ist und nicht durch die Zellen synthetisiert werden kann. Andererseits konnte Rosenthal (78) zeigen, dass fetale humane Fibroblasten Ölsäure bei beliebigen exogenen Fettsäurekonzentrationen vermehrt einbauen, verglichen mit der Linolsäure, was in den oben durchgeführten Versuchen nicht bestätigt werden konnte. Fetale humane Fibroblasten können jedoch nicht mit NHDF verglichen werden. Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Linolsäure vermehrt in Triacylglyceriden eingebaut wird, Ölsäure bevorzugt in Phospholipide (78). Phospholipide sind wesentliche Bestandteile der Lipiddoppelschicht von Zellmembranen, darüber hinaus scheinen einige Phospholipide als Entzündungsmediatoren zu fungieren (79). Triacylglyceride dienen hauptsächlich als Energiereserve. Für die Proliferation von Zellen sind sowohl Phospholipide und Triacylglyceride notwendig. Schlussendlich kann zu diesem Diskussionspunkt zusammengefasst werden, dass der Grund für die signifikant erhöhte Farbtintensität der NHDF unter Stimulation mit Linolsäure in Abbildung 9 unklar bleibt.

Vergleicht man nun die Fettsäureaufnahme in den verwendeten Zellen, so konnte durch die Messung der Farbtintensitäten des BODIPY-Signales in den KYSE und NHDF gezeigt werden, dass die Fettsäureaufnahme in den KYSE deutlich höher ist als in den NHDF. Der Stoffwechsel und die Zellteilungsgeschwindigkeit der Fibroblasten ist deutlich langsamer verglichen mit den Tumorzellen. Die KYSE mussten bereits nach wenigen Tagen in Kultur passagiert werden, da die Besiedelung der Zellkulturflaschen schnell sehr dicht wurde. Die NHDF zeigten hingegen eine langsamere Zellteilungsgeschwindigkeit. Durch diese Unterschiede in der Zellteilung könnte den Fibroblasten eine geringere Fettsäureaufnahme ausreichend sein. Tumorzellen haben einen hohen Energieverbrauch durch den erhöhten Metabolismus, sodass sich daraus schließen lässt, dass diese eine höhere Fettsäureaufnahme benötigen. Dies könnte wie oben erwähnt analog zu Keratinozyten über spezialisierte Transportproteine wie CD36, auch bekannt als Fettsäuretranslokase, die Familie der Fettsäuretransportproteine, auch bekannt als Solute-Carrier-Protein-Familie 27 oder die Plasmamembran-Fettsäurebindenden Proteine vermittelt werden. Für diese Transporter konnte bereits eine erhöhte Gen- und Proteinexpression in Tumoren nachgewiesen werden (73).

Eine weitere Überlegung ist, dass Fibroblasten, im Gegenteil zu den Tumorzellen, ihren Metabolismus nicht gut an aktuelle Nährstoffgegebenheiten anpassen können. Es konnte beobachtet werden, dass Tumorzellen besonders bei Abwesenheit von Glukose Fähigkeiten entwickeln, sich auf alternative Nährstoffwege umzustellen (80), (81). Die Messung der intrazellulären Konzentration von FS durch BODIPY zeigte, dass die KYSE alle einzeln angebotenen FS signifikant mehr aufgenommen haben, jedoch konnte diese intrazelluläre Konzentration an FS durch die Kombination aus allen drei FS weiter erhöht werden (Abbildung 10). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Tumorzellen ihren Fettsäurestoffwechsel zwar aktuellen Verfügbarkeiten anpassen können und alle FS gleichwertig verstoffwechseln können, jedoch könnte eine Kombination von verschiedenen FS (Nährstoffen) einen proliferativen Vorteil bieten und wird daher von den Zellen bevorzugt.

4.3.2 Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Fettsäureaufnahme *in vivo* im Xenograft Nacktmausmodell

Die *in vivo* Ergebnisse bezüglich der Fettsäureaufnahme stimmen mit den gerade diskutierten *in vitro* Ergebnissen überein. Es konnte besonders im Tumorgewebe, aber auch im Stroma, ein signifikant höherer Fettgehalt bei den Tieren mit einer fettreichen Diät gemessen werden. Das fettreiche Futter lässt sich also auch später *post mortem* im Fettgehalt der beiden untersuchten Gewebearten des Tumors wiederfinden (Abbildung 16). Auch hier ist dieses Versuchsergebnis von grundlegender Bedeutung. Es kann nur aufgrund dieser Befunde die Auswirkung der Fette auf die Hyaluronsäuresynthese diskutiert werden, wenn die Zellen die über die Tiernahrung angebotenen Fette auch tatsächlich aufgenommen haben. Der Fettgehalt verteilte sich je nach Futterzusammensetzung (Tabelle 4) wie folgt auf die Gruppen: FETT (Rohfettanteil im Futter: 30 %) > KON (Rohfettanteil im Futter: 6 %) > CHO (Rohfettanteil im Futter 5 %).

Es konnte generell in den Tumorzellen des Tumorgewebes deutlich stärkere Intensitäten der BODIPY-Färbung gemessen werden, verglichen mit den Zellen des Stromas. Auch diese Beobachtung bestätigt eine gesteigerte Fettsäureaufnahme in die Tumorzellen (61).

Neben BODIPY gibt es Alternativen um die Aufnahme von Fetten zu untersuchen. Für einen unmittelbar sichtbaren Nachweis der Aufnahme von FS benutzten Henking et al. (82) eine bioaktivierbare molekulare Bildgebungssonde in Form von Luciferin, welche an langkettige FS konjugiert wurde. Durch diesen nicht invasiven bildgebenden Ansatz kann die Fettsäureaufnahme in Gegenwart von Luciferase über die Lichterzeugung proportional zur zellulären Fettsäureaufnahme *in vivo* gemessen werden. Weiterhin

besteht die Möglichkeit der Messung einer Fettsäureaufnahme mittels radioaktiv markierten FS (75).

4.4 Einfluss der Nährstoffe auf die Hyaluronsäure-Synthese *in vitro* und *in vivo*

4.4.1 Einfluss von Fettsäuren auf die Hyaluronsäure-Synthese in Tumorzellen und Fibroblasten *in vitro*

Misst man den Hyaluronsäuregehalt der NHDF mittels HAP-Immunitäts-Assay (Abbildung 11) und Hyaluronsäurebindeprotein-Färbung (Abbildung 12), so konnte in beiden Versuchen keine erhöhte Hyaluronsäuremenge unter Fettsäurestimulation beobachtet werden. In der Literatur ist beschrieben, dass die Umwandlung von Fetten zu Glukosemetaboliten in Wirbeltieren nicht möglich ist. Es gibt folglich keine Möglichkeit, Acetyl-CoA zurück zu Pyruvat umzuwandeln, um es dann in die Glukoneogenese einzuschleusen und daraus später HA zu synthetisieren (65).

Interessanterweise lies sich jedoch bei den KYSE beobachten, dass sowohl perizellulär (Abbildung 13) als auch im Überstand der Tumorzellen (Abbildung 11) nach Stimulation mit den FS eine signifikant höhere Menge von HA gemessen werden konnte. Folglich scheinen Tumorzellen einen bisher unbekanntem Mechanismus entwickelt zu haben, damit aus einem erhöhten Fettsäureangebot eine erhöhte Hyaluronsäuresynthese resultieren kann.

In der HAP-Färbung der KYSE konnte bei der Ölsäure lediglich ein Trend zur gesteigerten Hyaluronsäuresynthese abgeleitet werden ($p = 0,0754$). Im HAP-Immunitäts-Assay konnte bei der Ölsäure ein $p < 0,005$ erreicht werden.

Außerdem ist noch ein weiterer interessanter Aspekt im Fettsäureabbau zu erwähnen. Ungeradzahlige FS können am Ende der β -Ox zu Propionyl-CoA oxidiert werden, nachdem vorab viele Acetyl-CoA Substrate entstanden sind. Propionyl-CoA ist ein Vorläufer von Succinyl-CoA und kann weiter in Pyruvat umgewandelt werden. Pyruvat kann dann in die Glukoneogenese eintreten (65). In diesen Versuchen wurden jedoch nur geradzahlige FS verwendet, welche nur zu Acetyl-CoA abgebaut werden können, sodass dieser Stoffwechselweg für die zentrale Fragestellung nicht von Bedeutung ist.

4.4.2 Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Hyaluronsäure-Synthese *in vivo* im Xenograft Nacktmausmodell

Es wurde bereits gezeigt, dass HA die Tumorprogression, Metastasierung, Angiogenese und Chemotherapieresistenz unterstützt (19), (20), (21), (22). Betrachtet man in

Abbildung 17 das Tumorgewebe, so ist zunächst auffällig, dass im Tumorgewebe deutlich höhere Signalintensitäten von HA gemessen werden können, verglichen mit dem Stroma. Fraglich ist, ob die Tumorzellen die produzierte HA später noch in das umgebende Stroma abgeben oder ob die synthetisierte HA im Tumorgewebe selbst bleibt.

Betrachtet man nun die FAT und die CHO Gruppe im Tumorgewebe, so scheint es, als würden die Tumorzellen auch *in vivo* unter einer fettreichen Diät signifikant mehr HA produzieren können als unter einer kohlenhydratreichen Diät (Abbildung 18). Wurde eine ausgewogene oder eine kohlenhydratreiche Nahrung angeboten, so konnte in diesen Versuchen trotz der Tatsache, dass HA aus Glukose gebildet wird, nicht so viel HA gebildet werden wie unter der fettreichen Diät. Somit konnte auch *in vivo* gezeigt werden, dass die Hyaluronsäuresynthese durch ein erhöhtes Fettsäureangebot gesteigert werden konnte.

Im Folgenden werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert wodurch eine gesteigerte Hyaluronsäuresynthese unter einem erhöhten Fettsäureangebot erklärt werden könnte:

Eine erste Überlegung wäre, dass das Acetyl-CoA aus der β -Ox im TCA zu Oxalacetat verstoffwechselt wird. Aus Oxalacetat könnte dann in der Glukoneogenese Phosphoenolpyruvat synthetisiert werden und letztendlich könnte daraus wiederum Glucose und theoretisch auch die Bausteine der HA entstehen. Dieser hypothetische Stoffwechselweg ist jedoch nicht möglich, da Oxalacetat für die Aufrechterhaltung des TCA essentiell ist und daher nicht für die Glukoneogenese verwendet werden kann (65).

Eine weitere Möglichkeit, aus Fetten Glukosemetaboliten herzustellen, ist der Glyoxylatzyklus (Abbildung 20). Dieser wurde bisher nur bei Pflanzen, Tieren, Pilzen und Bakterien beschrieben. Im Glyoxylatzyklus werden aus zwei Molekülen Acetyl-CoA ein C₄-Kohlenhydrat Succinat hergestellt, welches letztendlich über Oxalacetat in die Glukoneogenese eingeschleust werden kann (68). Hefezellen benutzen die Mehrheit des peroxisomalen Acetyl-CoA für den Glyoxylatzyklus, um Succinat für die Glukosesynthese zu erzeugen (83). Neuere Daten deuten darauf hin, dass zumindest einige menschliche Zellen mit Enzymen ausgestattet sind, die für den Glyoxylatzyklus erforderlich wären (84). Darüber hinaus wurden die Glyoxylatenzyme Malatsynthase und Isocitratlyase in tierischen Geweben gefunden (85): Gene, die für die Malatsynthase codieren, wurden in anderen Metazoen identifiziert, darunter in Anthropoden, Stachelhäuter und sogar in einigen Wirbeltieren. Säugetiere, die diese Gene besitzen, sind Kloakentiere und Beuteltiere, aber keine Plazenta-Säugetiere. Gene für die Isocitratlyase sind nur in Nematoden zu finden. Des Weiteren konnte in Homogenaten

menschlicher Leberzellen die beiden wichtigen Enzyme des Glyoxylatzyklus Isocitratlyase und Malatsynthase nachgewiesen werden (86). In der folgenden Abbildung wird der Glyoxylatzyklus dargestellt:

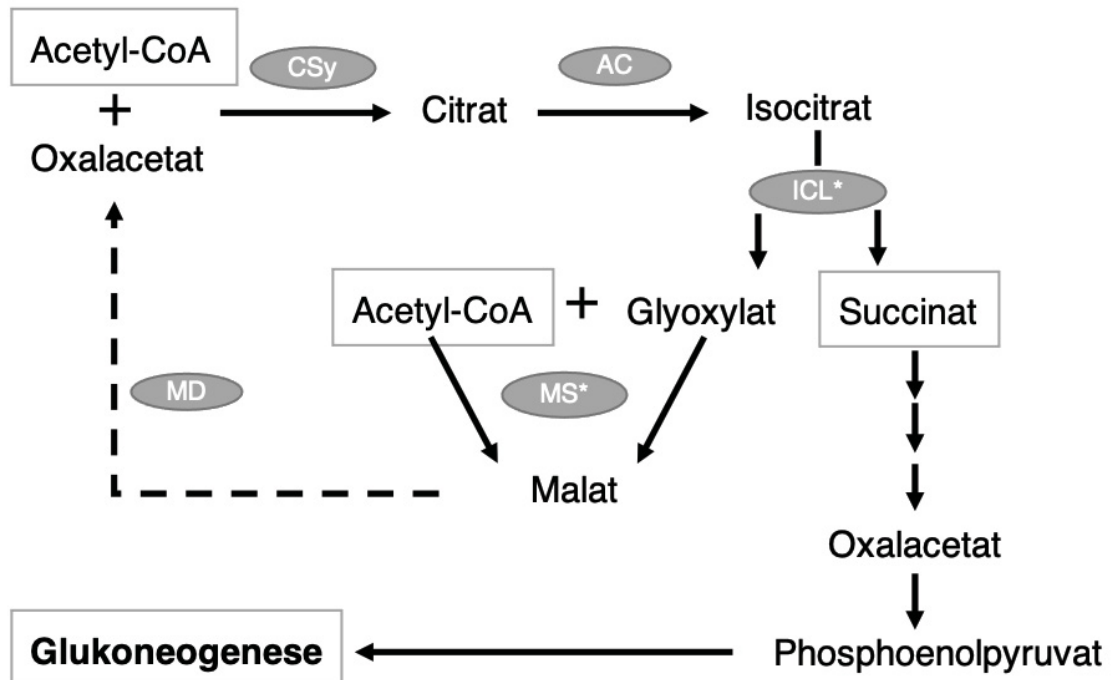


Abbildung 20: Glyoxylatzyklus bei Pflanzen: Generation eines C4-Kohlenhydrates aus zwei Acetyl-CoA

Übersicht über den Glyoxylatzyklus. Citratsynthase (**CSy**), Aconitase (**AC**), Isocitratlyase (**ICL**), Malatsynthase (**MS**), Malatdehydrogenase (**MD**), *ICL und MS können nicht in Plazentatieren exprimiert werden.

Der Glyoxylatzyklus könnte eine weitere, alternative Erklärung für die beobachteten Ergebnisse liefern. Hätten die Tumorzellen durch Mutationen oder neue Enzymfunktionen die Möglichkeit, die Funktionen der Isocitratlyase und Malatsynthase zu übernehmen, so könnten die Tumorzellen auf diese Art und Weise aus Acetyl-CoA Substrate bilden, welche in die Glukoneogenese eingespeist werden könnten. So könnte aus Fetten zunächst Glukosemetaboliten gebildet werden, welche der Hyaluronsäuresynthese dienen könnten. Dies würde die in Abbildung 11, Abbildung 13 und Abbildung 17 gemachte Beobachtung erklären, inwiefern ein erhöhtes Fettsäureangebot zu einem erhöhten Hyaluronsäuregehalt geführt hat. In den durchgeführten Versuchen wurde die Existenz dieser Enzyme jedoch nicht untersucht. Es müsste in weiteren Versuchen überprüft werden, ob Tumorzellen diese erforderlichen Enzyme besitzen, welche die beschriebenen Reaktionen katalysieren könnten. Mutationen in Stoffwechsellenzymen gehören zu den Schlüsselmerkmalen von Tumorzellen (87). Im Folgenden werden einige Beispiele aufgezählt: So ist das

Expressionsniveau einiger glykolytischer Enzyme beispielsweise der geschwindigkeitbegrenzenden Phosphofruktokinase erhöht (88) und Mutationen in Genen, die für Enzyme des TCA kodieren, (Aconitase, Isocitratdehydrogenase, Succinatdehydrogenase und Fumarathydratase) können zu einer Krebserkrankung führen. Tumorzellen mit Fumarathydratase-Mutation produzieren mehr Fumarat und Succinat (89). Ebenso konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Fettsäuresynthese bei menschlichen Krebsarten oft überexprimiert wird, wodurch die Abhängigkeit der Krebszellen von Lipiden unterstützt wird (90). Im Gegensatz zur effektiveren Fettsäuresynthese sind bestimmte Krebsarten auch auf die mitochondriale Fettsäureoxidation zur ATP Produktion angewiesen. Obwohl der Mechanismus, der die Fettsäureoxidation in Tumorzellen hochreguliert, nach wie vor unklar ist, kann die β -Ox über die ATP-Produktion Vorteile bringen (91).

Weiterhin würde ich gerne auf die aktuell beste Erklärung für die gesteigerte Hyaluronsäuresynthese unter einer fettreichen Ernährung von Twarock, Reichert et al. (92) eingehen. Dort konnte gezeigt werden, dass die Hyaluronsäuresynthese über eine Erhöhung des Hyaluronsäurevorläuferpools und über die O-GlcNacylierung von Proteinen aktiviert werden kann. In diesem Paper wurde mittels Dichloressigsäure die mitochondriale oxidative Phosphorylierung wiederhergestellt: Pyruvat wird zu Acetyl-CoA umgewandelt und kann im TCA umgesetzt werden (92). Für diesen Erklärungsansatz ist es wichtig hervorzuheben, dass man nicht davon ausgeht, dass Fette über Glukosemetaboliten eine Erhöhung der HA bewirken, sondern Acetyl-CoA über diesen Weg indirekt stimulierende Einflüsse auf die Hyaluronsäuresynthese haben kann. Demnach müssten die Fette nicht, wie bisher diskutiert zu Glukosemetaboliten umgewandelt werden, sondern es würde ausreichen, wenn viel Acetyl-CoA aus der β -Ox entsteht: Durch die vermehrte β -Ox bei erhöhtem Fettsäureangebot entsteht ein erhöhtes Angebot von Acetyl-CoA, welches über den Citratshuttle und die ATP-Citratlyase ins Zytosol geleitet werden könnte. Hier hätte Acetyl-CoA nun zwei Möglichkeiten, die Hyaluronsäuremenge zu erhöhen: Entweder wird Acetyl-CoA als Substrat für die D-Glukosamin-N-Acetyltransferase verwendet und somit für die Synthese von UDP-N-Acetyl-Glukosamin verbraucht; oder aber die O-N-Acetyl-Glukosamintransferase bewirkt eine O-GlcNacylierung der HAS, welche dadurch stabilisiert werden und mehr HA produzieren können (Abbildung 21) (92).

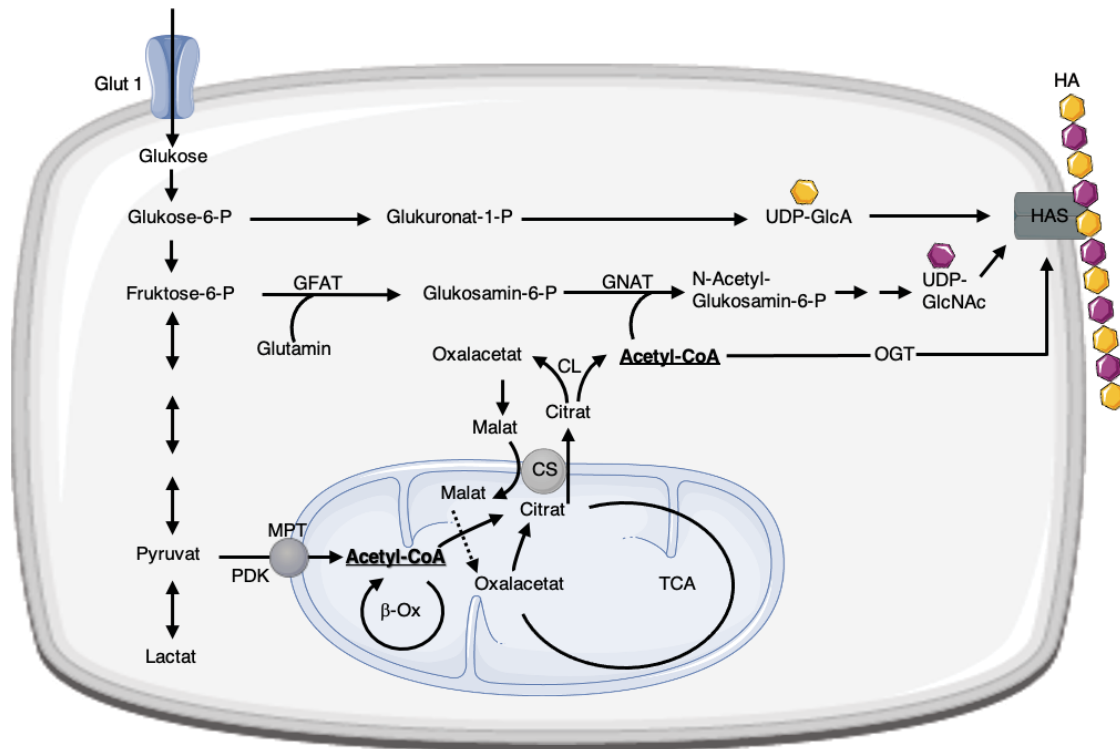


Abbildung 21: Schematisches Modell der metabolischen Interaktion von β -Oxidation, Citratzyklus und Hyaluronsäure-Synthese

Glukose wird über einen Glukosetransporter (z. B. **GLUT1**) aufgenommen und in der Glykolyse zu Pyruvat metabolisiert. Pyruvat gelangt über den mitochondrialen Pyruvatträger (**MPT**) ins Mitochondrium und wird über den Pyruvatdehydrogenase-Komplex (**PDK**) zu Acetyl-CoA verstoffwechselt. Acetyl-CoA kann ebenfalls über die β -Oxidation (β -Ox) im Mitochondrium synthetisiert werden. Dieses Acetyl-CoA wird im Citratzyklus (**TCA**) zu Citrat, damit es über den Citratshuttle (**CS**) ins Zytosol gelangen kann. Im Zytosol wird Citrat über die ATP-Citratlyase (**CL**) wieder zu Acetyl-CoA metabolisiert und das entstandene Oxalacetat gelangt über Malat zurück ins Mitochondrium, wo es wieder in den TCA eingeschleust werden kann. Das Acetyl-CoA kann nun über 2 Wege die Hyaluronsäuresynthese unterstützen: Acetyl-CoA wird als Substrat bei der Synthese von UDP-N-Acetyl-Glukosamin (**UDP-GlcNAc**) benötigt; oder Acetyl-CoA stimuliert die O-N-Acetyl-Glukosamintransferase (**OGT**), welche eine O-GlcNAcylierung der Hyaluronsäuresynthasen (**HAS**) bewirkt. Weitere Abkürzungen: Glutamin:Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase (**GFAT**), Acetyl-CoA:D-Glukosamin-N-Acetyltransferase (**GNAT**), UDP-Glukuronsäure (**UDP-GlcA**), Glukose-6-Phosphat (**Glukose-6-P**), Fructose-6-Phosphat (**Fructose-6-P**), Glukuronat-1-Phosphat (**Glukuronat-1-P**), Glukosamin-6-Phosphat (**Glukosamin-6-P**), N-Acetyl-Glukosamin-6-Phosphat (**N-Acetyl-Glukosamin-6-P**), (angepasst aus (92)).

Außerdem wäre eine weitere Erklärung denkbar: Die Umstellung der Energieversorgung auf Fette könnte dazu führen, dass mehr Glukose für die Hyaluronsäuresynthese bereit stehen würde. So könnte auch eine erhöhte Hyaluronsäuresynthese unter Fettsäurestimulation erklärt werden.

Letztendlich muss der Mechanismus für eine gesteigerte Hyaluronsäuresynthese unter einer fettreichen Ernährung in weiteren Versuchen aufgeklärt werden.

4.5 Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf das Tumolvolumen im Xenograft Nacktmausmodell

Im Folgenden soll diskutiert werden, welchen Effekt die Diäten auf die Proliferation der Tumore hatten. Die Gewichtskurve (Abbildung 14) bestätigt zunächst, dass sich die Körpergewichte der einzelnen Gruppen (FETT, CHO, KON) nicht signifikant unterschieden. Der Energiegehalt pro g Futter in allen drei Gruppen war identisch. Durch Messungen der Körpergewichte konnte weitgehend ausgeschlossen werden, dass das TV und die Tumorpheriferation durch ein unterschiedliches Futteraufnahmeverhalten der Mäuse verzerrt wurde. Für die *In-vivo*-Versuchen wurden sieben Wochen alte Männchen als Versuchstiere ausgewählt. Ältere Mäuse hätten ein besseres, ausgereifteres Immunsystem gehabt und bei weiblichen Mäusen hätte der hormonelle Zyklus die Versuche beeinflussen können.

Es zeigte sich, dass sich das Tumorstachstum zum Versuchsende zwischen den drei Versuchsgruppen signifikant unterschied (Abbildung 15). Die KON-Gruppe zeigte das schnellste Tumorstachstum und an Tag 42 konnten im Mittel die größten Tumore gemessen werden. Bei den Tumoren der CHO-Gruppe waren die Tumore an Tag 42 am kleinsten. Die Tumore der FETT-Gruppe waren signifikant kleiner als die der KON-Gruppe, jedoch wiederum signifikant größer als die Tumore der CHO-Gruppe. Daraus lässt sich folgendes ableiten: Ständen dem Tumor alle Nährstoffe zur Verfügung, wie in der KON-Gruppe, konnte eine maximale Tumorstachstion beobachtet werden. Bei einer einseitigen Diät wie in der CHO-Gruppe oder FETT-Gruppe, zeigten sich kleinere Tumore als bei einer ausgewogenen Ernährung. Diese Beobachtung würde bedeuten, dass eine Restriktion von Nährstoffen jeglicher Art das Tumorstachstum negativ beeinflusst. Vergleicht man die beiden Diätgruppen (CHO und FETT) miteinander, so scheint eine kohlenhydratreiche Ernährung in diesem Modell zum langsamsten Tumorstachstion zu führen. In der supportiven humanen Tumorstherapie wird den Patienten und Patientinnen keine spezielle Krebsdiät empfohlen. Es liegen keine zuverlässigen Daten vor, welche eine Einschätzung bezüglich einer einseitigen fettarmen oder kohlenhydratarmen Ernährung geben könnten. Vielmehr wird unter anderem eine tägliche Eiweißzufuhr von 1,2 - 1,5 g/kg KG empfohlen. Zudem sollte der Fettanteil mindestens 35 % der Gesamtenergiezufuhr betragen (93).

Weber et al. (94) geben einen interessanten Überblick über bisher durchgeführte präklinische und klinische Studien, die einige Variationen von ketogener Diät als Einzel- oder Kombinationstherapie bei Tumorerkrankungen angewendet haben. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die meisten präklinischen und klinische

Studien den Einsatz der ketogenen Diät als adjuvante Therapie unterstützen. Eine adjuvante Therapie in der Onkologie bedeutet, dass beispielsweise zu einer operativen Tumorsektion eine weitere unterstützende Maßnahme angewendet wird. 60 % der präklinischen Studien berichteten von einer tumorsuppressiven Wirkung unter einer ketogenen Diät, 17 % konnten keinen Einfluss auf das Tumorstadium feststellen und 10 % berichteten interessanterweise von unerwünschten oder proliferativen Effekten, wie sie auch in den Versuchen dieser Dissertation beobachtet werden konnten. Die meisten dieser Studien wurden mit Glioblastomzellen durchgeführt. Es ist von enormer Bedeutung, die Wirkung einer ketogenen Diät in präklinischen Studien für jede spezifische Tumor-Art einzeln zu bewerten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen könnten einen Hinweis geben, dass diese Tumorart unter einer fettreichen Ernährung schneller proliferiert als unter einer kohlenhydratreichen Ernährung (Abbildung 15). Andere interessante Ergebnisse beweisen ebenfalls, dass man eine ketogene, fettreiche Ernährung nicht ohne Bedenken bei onkologischen Patienten und Patientinnen anwenden sollte: Zhang et al. (95) konnten zeigen, dass das Tumorstadium im Xenograft-Maus-Modell mit HeLa-Zellen (humane Epithelzellen des Zervixkarzinomes) durch eine ketogene fettreiche Diät erhöht ist. Möglicherweise können diese Tumore Ketonkörper als Energiequelle verwenden. Es wurde ein Mechanismus beschrieben, welcher vorhersagen könnte, ob eine ketogene Diät effektiv sein könnte: So scheint die Expression der ketolytischen Enzyme 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase-1 (BDH1) und 3-Oxosäure-CoA-Transferase-1 (OXCT1) eine entscheidende Rolle zu spielen. Tumore mit hoher Expression dieser Enzyme können möglicherweise in der Lage sein, Ketonkörper zu verstoffwechseln, wodurch ein schlechteres Ansprechen auf die ketogene Ernährung vorhergesagt werden kann und der Tumor stärker proliferiert. Des Weiteren konnten Xia et al. (96) zeigen, dass eine fettreiche ketogene Ernährung den Serumspiegel von Acetoacetat erhöht, was zu einem erhöhten Tumorstadiumspotential von BRAF V600- exprimierenden menschlichen Melanomzellen in Xenotransplantat-Mäusen geführt hat.

Weitere Studien sind notwendig, um Mechanismen aufzudecken, welche unterschiedliches Ansprechen von Tumoren auf eine fettreiche Ernährung erklären können.

Betrachtet man zuletzt noch die Tatsache, dass generell eine Restriktion von Fetten oder Kohlenhydraten das Tumorstadium negativ beeinflusst hat, so könnte überlegt werden, welchen Einfluss ein Verzicht jeglicher Nährstoffe auf die Tumorstadiumproliferation haben würde. Onkologische Patienten und Patientinnen sind jedoch meist schon durch

einen kachektischen Ernährungszustand geprägt, sodass diese Art der supportiven Therapie eher nicht infrage kommen würde. Nencioni et al (97) konnten zeigen, dass Fasten oder Fasten-ähnliche Diäten zu weitreichenden Veränderungen führen, welche die Anpassungs- und Überlebensfähigkeit von Krebszellen verringern und gleichzeitig die Wirkung von Chemotherapien verbessern konnten. Gleichzeitig kann durch Fasten zu bestimmten Zeiten während der Chemotherapie die Resistenz der gesunden Zellen gegen die Chemotherapie erhöht werden. Folglich können so Nebenwirkungen der Chemotherapie verringert werden. Trotzdem ist das Fasten für die meist kachektischen Patienten oft nicht möglich.

4.6 Zusammenhang zwischen dem beobachteten Tumolvolumen und der Hyaluronsäure-Synthese

Betrachtet man die Zunahme des TV im Zeitverlauf (Abbildung 15), so zeigte die KON-Gruppe von Beginn an ein deutlich schnelleres Tumorstadium als die beiden Diät-Gruppen. So könnte argumentiert werden, dass die Tumore bei einer ausgewogener Ernährung am schnellsten proliferieren können, da ihnen alle Nährstoffe zur Verfügung stehen. Vergleicht man die beiden Diät-Gruppen miteinander, so zeigte sich erst ungefähr an Tag 35 eine signifikante Trennung zwischen der Tumorstadium der FETT- und der CHO-Gruppe. Die beiden Diätgruppen enthalten eine große Menge des jeweiligen Nährstoffes (Tabelle 4). Bei den Mäusen wurde bereits 5 Tage vor Injektion der Tumorzellen mit der jeweiligen Diät begonnen, sodass der Stoffwechsel in den Mäusen je nach Gruppe zum Zeitpunkt der Injektion angepasst war. Durch dieses Vorgehen sollte ausgeschlossen werden, dass die vorab normale Ernährung noch einen Einfluss auf die spätere Tumorstadiuminjektion nehmen konnte. Dadurch, dass in den ersten 35 Tagen des Versuches eine langsamere Proliferation in den beiden Diät-Gruppen beobachtet werden konnte, scheint es, als brauche der Tumor eine gewisse Zeit, den Stoffwechsel an die einseitige Ernährung anzupassen. Hat sich der Tumor dann jedoch an die einseitige Ernährung angepasst, so scheint es als kann der Tumor unter einer fettreichen Diät schneller proliferieren als unter einer kohlenhydratreichen Diät.

Schaut man sich zusätzlich noch den Hyaluronsäuregehalt der Tumore der Versuchsgruppen an, so bilden die Tumore der FETT-Gruppe interessanterweise mehr HA als die Tumore der CHO-Gruppe, obwohl bis jetzt noch keine Verbindung zwischen dem Fettsäuremetabolismus und der Hyaluronsäuresynthese bekannt ist. Analog zu den Tumorstadiumskurven bilden die Tumore der FETT-Gruppe, die schneller proliferieren als die Tumoren der CHO-Gruppe auch mehr HA, wodurch das schnellere

Tumorwachstum in der FETT-Gruppe verglichen zur CHO-Gruppe erklärt werden könnte.

Darüber hinaus ist bekannt, dass ein Tumor mehr HA bildet, wenn Stress auf die Tumorzellen einwirkt (98). Die HA könnte folglich reaktiv als protektiver Faktor gegen Stress gebildet werden: Unter einer ausgewogenen Ernährung bildet der Tumor nicht so viel HA, da er keinen Nährstoffmangel hat, verglichen mit den beiden Diätgruppen. Durch die Diät werden den Tumorzellen nur einseitige Nährstoffe angeboten, sodass die Tumorzellen einer Stresssituation ausgesetzt sind. So könnte der höhere HA Gehalt im Stroma in den beiden Diätgruppen erklärt werden (Abbildung 18). Allerdings zeigte sich lediglich ein Trend zu einer vermehrten Hyaluronsäuresynthese in den beiden Diätgruppen im Stroma. Im Tumorgewebe konnte signifikant mehr HA in der FETT-Gruppe gebildet werden, verglichen mit der CHO-Gruppe. Diese Beobachtung steht mit den In-vitro-Versuchen im Einklang, dass nur die Tumorzellen und nicht die Fibroblasten eine erhöhte HA-Synthese unter einem gesteigerten Fettsäure-Angebot aufwiesen und bestätigt die Vermutung, dass es nur in den Tumorzellen eine Verbindung zwischen Fettsäure-Angebot und HA-Synthese zu geben scheint.

4.7 Einfluss von Fetten/Kohlenhydraten auf die Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 *in vivo* im Xenograft Nacktmausmodell

Die Beteiligung des Hyaluronsäurerezeptors CD44 an der Tumorprogression wurde für viele Tumorarten in klinischen Studien bestätigt (52). Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus, durch den die HA-CD44-Kooperation den malignen Phänotyp beeinflusst und zum Tumorwachstum beiträgt, ist jedoch noch nicht vollständig verstanden (99). Misra et al. (53) beschreiben drei Möglichkeiten, wie HA mit CD44 interagieren könnte: CD44 bindet an lösliche extrazelluläre Hyaluronsäuremoleküle und extrazelluläre Matrix oder CD44 interagiert mit Rezeptortyrosinkinasen und stimuliert antiapoptotische Signalwege und induziert Medikamentenresistenz. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass CD44 als Co-Rezeptor fungiert. Jedenfalls ist die Überexpression von Isoformen von CD44 am häufigsten mit der Tumorprogression verbunden, während der Verlust mit der Hemmung des Tumorwachstums gekoppelt ist (52). So konnte auch in diesen Versuchen beobachtet werden, dass die stärkste Signalintensität von CD44 in den Tumoren der KON-Gruppen gemessen wurde (Abbildung 19), was mit der Tumorproliferationskurve (Abbildung 15) übereinstimmt. So konnte auch in diesen Versuchen bestätigt werden, dass CD44 als Proliferationsmarker gesehen werden kann

(100). Welche Signalwege wann und wo genau aktiviert werden und zu einer Proliferation der Tumorzellen führen, muss in weiteren Versuchen überprüft werden.

Obwohl die FETT-Gruppe am meisten HA synthetisiert hat, ist die Expression von CD44 in der FETT-Gruppe geringer als in der KON-Gruppe, welche weniger HA produziert hat. Eine mögliche Erklärung dafür wäre der Mechanismus der *Downregulation*: Vor allem bei Hormonen und Neurotransmittern wird die Herunterregulation (*Downregulation*) beispielsweise von Rezeptoren häufig beobachtet. Dies bedeutet, dass durch eine Überstimulation beispielsweise eines Neurotransmitters deren Rezeptoren in der Anzahl oder Funktion herunterreguliert werden (65). Konkret auf die durchgeführten Versuche bezogen, könnte nun wie folgt argumentiert werden: HA wurde besonders viel in der FETT-Gruppe synthetisiert, sodass es zu einem Überangebot von HA gekommen sein könnte. Dies könnte folglich zu einer Abnahme der CD44-Rezeptordichte in der FETT-Gruppe geführt haben.

Es sind weitere Versuche notwendig, um potenzielle Zusammenhänge zwischen der Tumorpheriferation, Fetten, HA und der CD44-Expression aufzuklären.

4.8 Einschränkungen und Ausblick

Eine Einschränkung dieser Studie ist, dass für die Versuche nur eine spezielle Tumorzelllinie verwendet wurde. Weiterhin könnte für genauere Messungen des Metabolismus der Tiere ein Stoffwechselkäfig zur Anwendung kommen. Auf diese Art und Weise kann eine genauere Messung der Futteraufnahme erfolgen. Durch die Gewichtskontrollen (Abbildung 14) wurde aber indirekt gezeigt, dass alle Tiere ungefähr die gleiche Futtermenge aufgenommen haben. Weiterhin könnte der Einfluss einer proteinreichen Ernährung auf das Tumorwachstum analysiert werden. In den drei Versuchsgruppen war zwar ein Proteinanteil enthalten (Tabelle 4), dieser könnte aber noch deutlich erhöht werden.

Letztendlich muss die Erklärung für eine gesteigerte Hyaluronsäuresynthese unter einer fettreichen Ernährung in weiteren Versuchen aufgeklärt werden. Denkbar wäre beispielsweise ein *In-vitro*-Versuch mit radioaktiv markierten Fetten. Im Überstand der Tumorzellen könnte über die Ionisierung gemessen werden, ob radioaktiv markierte HA entstanden ist. Damit könnte der Beweis gelingen, dass die angebotenen FS in die Hyaluronsäuresynthese der Tumorzellen eingebunden werden. Bisher wurde aufgrund der durchgeführten Versuche nur gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen den angebotenen Fetten und der produzierten HA besteht, aber nicht, welcher Mechanismus dieser Beobachtung zugrunde liegt. Außerdem soll in nachfolgenden Versuchen das Metabolom der Zellen mittels Massenspektrometrie analysiert werden. So könnten die einzelnen Metabolite des Glukose- und Fettsäurestoffwechsels bestimmt werden. Nach Stimulation der Zellen mit FS könnte man folglich die Stoffwechselwege beobachten, welche vielleicht in einem veränderten Maße ablaufen würden.

Die durchgeführten nicht-klinischen Versuche stellen bisher lediglich einen Ansatz für weitere Forschungen dar und sind noch nicht ausreichend für eine Entscheidung, ob die Therapie bei onkologischen Patienten und Patientinnen durch eine bestimmte Diät ergänzt werden sollte. Diese Studie kann lediglich als Hinweis gesehen werden, dass eine Umstellung der Ernährung das Tumorwachstum beeinflussen kann.

5 Schlussfolgerung

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Restriktion von Fetten oder Kohlenhydraten das Tumorwachstum negativ beeinflusst. Die Gabe einer kohlenhydratreichen Ernährung führt nicht zur maximalen Tumorprogression, wie aufgrund der Warburghypothese vermutet, sondern die Tumorzellen scheinen Fette in besonderem Maße zur Energiegewinnung und damit zur Tumorphiliferation verwenden zu können. Weiterhin ist es jedoch von besonderer Bedeutung, die Wirkung einer fettreichen Diät zunächst in präklinischen Studien für jede Art von Tumor zu bewerten, bevor die Entscheidung über eine supportive Ernährungstherapie bei onkologischen Patienten und Patientinnen getroffen werden kann. Diese Versuche beweisen ebenfalls, dass Tumorzellen ihren Stoffwechsel aktuellen Gegebenheiten anpassen können und es kann nun zusammenfassend beantwortet werden: Die Experimente liefern erste Hinweise, dass die Hyaluronsäuresynthese durch ein erhöhtes Angebot von FS gesteigert werden kann. Auf welche Art und Weise dies geschieht, muss in weiteren Versuchen geprüft werden. Zukünftig könnten Veränderungen im Fettsäuremetabolismus von Tumorzellen, unter Berücksichtigung des Hyaluronsäuremetabolismus neue Angriffspunkte einer tumorsuppressiven Therapie darstellen. Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass CD44 als Proliferationsmarker in Tumorzellen Verwendung finden könnte.

6 Literaturverzeichnis

1. Sung H *et al.* **Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2021;71(3):209–249.
2. Ferlay J *et al.* **Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** *International Journal of Cancer.* 2014;136(5):E359–E386.
3. Thrift AP. **The epidemic of oesophageal carcinoma: Where are we now?** *Cancer Epidemiology.* 2016;41:88–95.
4. Pandeya N *et al.* **Associations of duration, intensity, and quantity of smoking with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus.** *American Journal of Epidemiology.* 2008;168(1):105–114.
5. Pandeya N *et al.* **Alcohol consumption and the risks of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus.** *Gastroenterology.* 2009;136(4):1215–1224.e2.
6. Prabhu A *et al.* **The synergistic effects of alcohol and tobacco consumption on the risk of esophageal squamous cell carcinoma: A meta-analysis.** *American Journal of Gastroenterology.* 2014 Jun;109(6):822–827.
7. Stahl M *et al.* **Oesophageal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Annals of Oncology.* 2013;24(6):vi51–vi56.
8. Edge SB, Compton CC. **The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM.** *Annals of Surgical Oncology.* 2010;17(6):1471–1474.
9. Pennathur A *et al.* **Oesophageal carcinoma.** *The Lancet.* 2013;381(2):400–412.
10. Chanmee T *et al.* **Hyaluronan: A modulator of the tumor microenvironment.** *Cancer Letters.* 2016;375(1):20–30.
11. Lin EW *et al.* **The tumor microenvironment in esophageal cancer.** *Oncogene.* 2016;35(41):5337–5349.
12. Wang C *et al.* **Hyaluronan distribution in the normal epithelium of esophagus, stomach, and colon and their cancers.** *American Journal of Pathology.* 1996;148(6):1861–1869.
13. Auvinen P *et al.* **Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival.** *American Journal of Pathology.* 2000;156(2):529–536.
14. Lipponen P *et al.* **High stromal hyaluronan level is associated with poor differentiation and metastasis in prostate cancer.** *European Journal of Cancer.* 2001;37(7):849–856.
15. Anttila MA *et al.* **High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer.** *Cancer Research.* 2000;60(1):150–155.

16. 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.** *International Journal of Cancer*. 2001;95(1):12–17.
17. Park JB *et al.* **Role of hyaluronan in glioma invasion.** *Cell Adhesion & Migration*. 2008;2(3):202–207.
18. Koyama H *et al.* **Significance of tumor-associated stroma in promotion of intratumoral lymphangiogenesis.** *American Journal of Pathology*. 2008;172(1):179–193.
19. Koyama H *et al.* **Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment.** *American Journal of Pathology*. 2007;170(3):1086–1099.
20. Toole BP *et al.* **Hyaluronan: A critical component of epithelial-mesenchymal and epithelial-carcinoma transitions.** *Cells Tissues Organs*. 2005;179(1–2):66–72.
21. Bharadwaj AG *et al.* **Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing.** *American Journal of Pathology*. 2009;174(3):1027–1036.
22. Misra S *et al.* **Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan.** *Journal of Biological Chemistry*. 2003;279(28):25285–25288.
23. Toole BP. **Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue.** *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(7):528–539.
24. Xie Y *et al.* **Pulmonary delivery of cisplatin – hyaluronan conjugates via endotracheal instillation for the treatment of lung cancer.** *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;392(1–2):156–163.
25. Hingorani SR *et al.* **Phase Ib Study of PEGylated recombinant human hyaluronidase and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer.** *Clinical Cancer Research*. 2016;22(12):2848–2854.
26. Erickson M, Stern R. **Chain gangs: New aspects of hyaluronan metabolism.** *Biochemistry Research International*. 2011;2012(article 893947):1-9.
27. Twarock S *et al.* **Hyperglycaemia and aberrated insulin signalling stimulate tumour progression via induction of the extracellular matrix component hyaluronan.** *International Journal of Cancer*. 2017;141(4):791–804.
28. Stern R *et al.* **Hyaluronan fragments: An information-rich system.** *European Journal of Cell Biology*. 2006;85(8):699–715.
29. Toole BP. **Hyaluronan in morphogenesis.** *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2001;12(2):79–87.
30. Wells AF *et al.* **Correlation between increased hyaluronan localized in arthritic synovium and the presence of proliferating cells – A role for macrophage-derived.** *Arthritis and Rheumatism*. 1992;35(4):391–396.
31. Tammi R *et al.* **Hyaluronan synthase induction and hyaluronan**

- accumulation in mouse epidermis following skin injury.** *Journal of Investigative Dermatology.* 2005;124(5):898–905.
32. Kumar S, West DC. **The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity.** *Experimental Cell Research.* 1989;183(1):179–196.
33. Bollyky PL *et al.* **Cutting edge: High molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4 + CD25 + regulatory T cells.** *Journal of Immunology.* 2007;179(2):744–747.
34. Slevin M *et al.* **Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses.** *Journal of Biological Chemistry.* 2002;277(43):41046–41059.
35. Sironen RK *et al.* **Hyaluronan in human malignancies.** *Experimental Cell Research.* 2011;317(4):383–391.
36. Weigel PH *et al.* **Hyaluronan synthases.** *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(22):13997–14000.
37. Karousou E *et al.* **The activity of hyaluronan synthase 2 is regulated by dimerization and ubiquitination.** *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(31):23647–23654.
38. Okuda H *et al.* **Hyaluronan synthase HAS2 promotes tumor progression in bone by stimulating the interaction of breast cancer stem-like cells with macrophages and stromal cells.** *Cancer Research.* 2012;72(2):537–547.
39. Tammi MI *et al.* **Activated hyaluronan metabolism in the tumor matrix — Causes and consequences.** *Matrix Biology.* 2019;78–79:147–164.
40. Tammi R *et al.* **Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture.** *Journal of Investigative Dermatology.* 1991;97(1):126–130.
41. Stern R. **Hyaluronan metabolism: A major paradox in cancer biology.** *Pathologie Biologie.* 2005;53(7):372–382.
42. Agren UM *et al.* **Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture.** *Free Radical Biology & Medicine.* 1997;23(7):996–1001.
43. Csoka AB *et al.* **Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31.** *Genomics.* 1999;60(3):356–361.
44. Knudson W *et al.* **CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan.** *Matrix Biology.* 2002;21(1):15–23.
45. Csoka AB *et al.* **The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes.** *Matrix Biology.* 2001;20(8):499–508.
46. Ahrens T *et al.* **CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation.** *Journal of Investigative Dermatology.*

- 2001;116(1):93–101.
47. Turley EA *et al.* **Signaling properties of hyaluronan receptors.** *Journal of Biological Chemistry.* 2001;277(7):4589–4592.
 48. Bono P *et al.* **Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor.** *Molecular Biology of the Cell.* 2001;12(4):891–900.
 49. Pandey MS *et al.* **The cytoplasmic domain of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) contains multiple endocytic motifs targeting coated pit-mediated internalization.** *Journal of Biological Chemistry.* 2008;283(31):21453–21461.
 50. Bourguignon LYW *et al.* **A CD44-like endothelial cell transmembrane glycoprotein (GP116) interacts with extracellular matrix and ankyrin.** *Molecular and Cellular Biology.* 1992;12(10):4464–4471.
 51. Lokeshwar VB *et al.* **The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14 / v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation.** *Journal of Biological Chemistry.* 1996;271(39):23853–23864.
 52. Karousou E *et al.* **Roles and targeting of the HAS / hyaluronan / CD44 molecular system in cancer.** *Matrix Biology.* 2017;59:3–22.
 53. Misra S *et al.* **Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer.** *Frontiers in Immunology.* 2015;6:1–31.
 54. Olofsson B *et al.* **Knock-down of CD44 regulates endothelial cell differentiation via NFkB-mediated chemokine production.** *PLOS ONE.* 2014;9(3):1–12.
 55. Schmitt M *et al.* **CD44 functions in Wnt signaling by regulating LRP6 localization and activation.** *Nature - Cell Death and Differentiation.* 2015;22(4):677–689.
 56. Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: The next generation.** *Cell.* 2011;144(5):646–674.
 57. Warburg O. **On the origin of cancer cells.** *Science.* 1956;123(3191):309–314.
 58. Santos CR, Schulze A. **Lipid metabolism in cancer.** *FEBS Journal.* 2012;279(15):2610–2623.
 59. Mashima T *et al.* **De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy.** *Nature - British Journal of Cancer.* 2009;100(9):1369–1372.
 60. Ookhtens M *et al.* **Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor.** *American Journal of Physiology.* 1984;247(1–2):R146–153.
 61. Currie E *et al.* **Cellular fatty acid metabolism and cancer.** *Cell Metabolism.* 2013;18(2):153–161.
 62. Hatzivassiliou G *et al.* **ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell**

- growth.** *Cancer Cell.* 2005;8(4):311–321.
63. Igal RA. **Stearoyl-CoA desaturase-1: A novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer.** *Carcinogenesis.* 2010;31(9):1509–1515.
64. Pike LS *et al.* **Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells.** *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics.* 2011;1807(6):726–734.
65. Heinrich PC *et al.* **Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie.** Springer. 2014; 9. Auflage.
66. Carta G *et al.* **Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications.** *Frontiers in Physiology.* 2017;8(article 902):1–14.
67. Biswas S *et al.* **Non-glucose metabolism in cancer cells-is it all in the fat?** *Cancer Metastasis Reviews.* 2012;31(3–4):689–698.
68. Dolan SK, Welch M. **The glyoxylate shunt , 60 years on.** *Annual Review of Microbiology.* 2018;72:309–330.
69. Alsabeeh N *et al.* **Cell culture models of fatty acid overload: Problems and solutions.** *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2018;1863(2):143–151.
70. Tomayko MM, Reynolds CP. **Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 1989;24(3):148–154.
71. Yadav S *et al.* **Diverse Stakeholders of Tumor Metabolism: An Appraisal of the emerging approach of multifaceted metabolic targeting by 3-bromopyruvate.** *Frontiers in Pharmacology.* 2019;10(article 728):1–22.
72. Keenan M, Chi JT. **Alternative fuels for cancer cells.** *Cancer Journal.* 2015;21(2):49–55.
73. Koundouros N, Poulogiannis G. **Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer.** *Nature - British Journal of Cancer.* 2020;122(1):4–22.
74. Yoshida T *et al.* **CD36 expression is associated with cancer aggressiveness and energy source in esophageal squamous cell carcinoma.** *Annals of Surgical Oncology.* 2021;28(2):1217–1227
75. Dubikovskaya E *et al.* **Measurement of long-chain fatty acid uptake into adipocytes.** *Methods in Enzymology.* 2014;538:107–134.
76. McArthur MJ *et al.* **Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids.** *Journal of Lipid Research.* 1999;40(8):1371–1383.
77. Schürer NY *et al.* **Evidence for a novel keratinocyte fatty acid uptake mechanism with preference for linoleic acid: Comparison of oleic and linoleic acid uptake by cultured human keratinocytes, fibroblasts and a human hepatoma cell line.** *Biochimica and Biophysica Acta – Lipids and Lipid Metabolism.* 1994;1211(1):51–60.

78. Rosenthal MD. **Selectivity in incorporation, utilization and retention of oleic and linoleic acids by human skin fibroblasts.** *Lipids*. 1980;15(10):838–848.
79. Lordan R *et al.* **Phospholipids of animal and marine origin: Structure, function, and anti-inflammatory properties.** *Molecules*. 2017;22(11):1–32.
80. Boroughs LK, DeBerardinis RJ. **Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth.** *Nature Cell Biology*. 2015;17(4):351–359.
81. Soga T. **Cancer metabolism: Key players in metabolic reprogramming.** *Cancer Science*. 2013;104(3):275–281.
82. Henkin AH *et al.* **Real time non invasive imaging of fatty acid uptake in vivo.** *ACS Chemical Biology*. 2012;7(11):1884–1891.
83. Kunze M *et al.* **A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2006;1763(12):1441–1452.
84. Strittmatter L *et al.* **CLYBL is a polymorphic human enzyme with malate synthase and β -methylmalate synthase activity.** *Human Molecular Genetics*. 2014;23(9):2313–2323.
85. Kondrashov FA *et al.* **Evolution of glyoxylate cycle enzymes in Metazoa: Evidence of multiple horizontal transfer events and pseudogene formation.** *Biology Direct*. 2006;1:1–14.
86. Davis WL, Goodman DBP. **Evidence for the glyoxylate cycle in human liver.** *The Anatomical Record*. 1992;234(4):461–468.
87. Sreedhar A, Zhao Y. **Dysregulated metabolic enzymes and metabolic reprogramming in cancer cells.** *Biomedical Reports*. 2018;8(1):3–10.
88. El-Bacha T *et al.* **Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer.** *Molecular Genetics and Metabolism*. 2003;79(4):294–299.
89. Gaude E, Frezza C. **Defects in mitochondrial metabolism and cancer.** *Cancer & Metabolism*. 2014;2(article 10):1–9.
90. Bauerschlag DO *et al.* **Fatty acid synthase overexpression: Target for therapy and reversal of chemoresistance in ovarian cancer.** *Journal of Translational Medicine*. 2015;13(article 146):1–12.
91. Carracedo A *et al.* **Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight.** *Nature Reviews Cancer*. 2013;13(4):227–232.
92. Twarock S *et al.* **Hyaluronan matrix inhibition enhances metabolic anticancer therapy by dichloroacetate in vitro and in vivo.** *British Journal of Pharmacology*. 2019;176(23):4474–4490.
93. Arends J *et al.* **S3-Leitlinie: Klinische Ernährung in der Onkologie.** *Aktuelle Ernährungsmedizin*. 2015;40(5):e1–e74.
94. Weber DD *et al.* **Ketogenic diet in the treatment of cancer – Where do we stand?** *Molecular Metabolism*. 2019;33:102–121.

95. Zhang J *et al.* **Low ketolytic enzyme levels in tumors predict ketogenic diet responses in cancer cell lines in vitro and in vivo.** *Journal of Lipid Research.* 2018;59(4):625–634.
96. Xia S *et al.* **Prevention of dietary fat-fueled ketogenesis attenuates BRAF V600E tumor growth.** *Cell Metabolism.* 2017;25(2):358–373.
97. Nencioni A *et al.* **Fasting and cancer: Molecular mechanisms and clinical application.** *Nature Reviews Cancer.* 2019;18(11):707–719.
98. Wang A *et al.* **Hyaluronan matrices in pathobiological processes.** *FEBS Journal.* 2011;278(9):1412–1418.
99. Misra S *et al.* **Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy.** *FEBS Journal.* 2011;278(9):1429–1443.
100. Chen C *et al.* **The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications.** *Journal of Hematology and Oncology.* 2018;11(article 64):1–23.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Klinik für Pharmakologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.

An erster Stelle möchte ich hier meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer für die Betreuung und Ermöglichung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock danke ich für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas und die Mitbetreuung der Arbeit. Insbesondere bedanke ich mich für die vielen anregenden Diskussionen sowie für die stets geöffnete Tür und das sehr angenehme Arbeitsklima, welches Freiräume und Eigeninitiative gefördert hat.

Herrn Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoeklein danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Institut danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit, welche besonders zu einer sehr angenehmen Zeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich hier Christina Reichert und Oliver Reiners nennen, die mich täglich motiviert und unterstützt haben. Vielen Dank Christina für die vielen fördernden Ratschläge und die Korrekturlesung.

Ein ganz besonderer Dank gilt ferner meinen Eltern Iris und Bernhard Syben, meiner Schwester Elena und meinen Großeltern Christine und Paul Reinartz. Ich bin sehr dankbar für die intensive Förderung und die bedingungslose Unterstützung in allen Lebensbereichen.

Danken möchte ich außerdem meiner Freundin Theresa Tenge für die tolle Freundschaft, die im Studium begonnen hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Janik Veken für die Geduld, Rücksichtnahme und Aufmunterung bedanken.

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.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.