

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

**Synergistische Wirksamkeit einer pharmakologischen
Kombinationstumortherapie bestehend aus
Hyaluronsäure-Synthese-Inhibition und
Mitochondrien-Reaktivierung**

Dissertation

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

Vorgelegt von
Ruth Katharina Bach

2023

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

gez.:

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

Erstgutachter: PD Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock

Zweitgutachterin: Professor Dr. rer. nat. Martina Krüger

Der Mensch muß bei dem Glauben verharren, daß das Unbegreifliche
begreiflich sei: er würde sonst nicht forschen.

Johann Wolfgang von Goethe

Gut Ding will Weile haben!

Deutsches Sprichwort

In Liebe meinen Eltern und meinem Mann gewidmet, ohne die so vieles nicht möglich
wäre. Und meiner lieben Freundin Uli, die Freude und Leid des wissenschaftlichen
Arbeitens mit mir geteilt hat. Danke.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgendem Paper veröffentlicht:

Sören Twarock, Christina Reichert, Katharina Bach, Oliver Reiners, Inga Kretschmer, Daniel J. Gorski, Katharina Gorges, Maria Grandoch, Jens W. Fischer, 2019, *Inhibition of the hyaluronan matrix enhances metabolic anticancer therapy by dichloroacetate in vitro and in vivo*. Br J Pharmacol, 2019. 176(23): p. 4474-4490

Zusammenfassung

Ösophaguskarzinome zählen zu einer recht schwierig zu behandelnden Krebsart und weisen darüber hinaus eine schlechte Prognose auf. Daher ist eine weitere Grundlagenforschung an dieser Tumorart interessant auch für die Identifikation neuer Therapieansätze insbesondere auf molekularer Ebene.

Es ist bekannt, dass Hyaluronsäure (HA) bei der Tumorentstehung eine wachstums- und proliferationsfördernde Wirkung besitzt. Zwischen der Überlebensrate und einem erhöhten HA-Gehalt besteht ein direkter Zusammenhang. Ebenso hat sich gezeigt, dass eine erhöhte Transkription der HA-Synthasen (HAS1-3) ein Hinweis für eine schlechtere Prognose beim Kolonkarzinom ist. Eine Herunterregulierung von HAS-Isoformen beim Prostatakarzinom führt zu einer Inhibierung des Tumorwachstums sowie der Vaskularisierung. Es werden bereits bei einigen Tumorthérapien Hyaluronidasen eingesetzt. Auch bei der Metastasierung sowie Zytostatikaresistenz spielt HA eine bedeutende Rolle.

4-Methylumbelliferon (4MU) hemmt HAS1-3. Es wird bereits sowohl als Gallenwegs-Therapeutikum als auch zur Behandlung erhöhter Glykosaminoglykan-Spiegel genutzt. Bei *in vivo* Versuchen mit Nagetieren zeigte 4MU Erfolg in der Behandlung von Melanomen.

Dichloressigsäure (DCA) hemmt die anaerobe Glykolyse durch Aktivierung der in vielen Tumorzellen inaktivierten Pyruvatdehydrogenase in Mitochondrien und hat somit einen selektiven Einfluss auf Tumorzellen. Durch diese Reaktivierung werden mitochondriale Apoptosewege und somit der Untergang der Tumorzelle aktiviert.

In Vorversuchen *in vitro* konnte eine synergistische Wirkung von 4MU und DCA auf die Proliferation und das Wachstum von Krebszellen gezeigt werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher, die synergistische Wirkung der beiden Substanzen *in vivo* an einem Xenograft-Nacktmaus-Modell mit Ösophaguskarzinom-Zellen zu untersuchen und den vorher *in vitro* gesehenen Synergismus zu bestätigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch die Kombinationstherapie eine Stagnation des Tumorwachstums, eine Reduktion der Proliferationsrate, eine gesteigerte Apoptose sowie eine verminderte Neoangiogenese erreicht werden können.

Summary

Esophageal carcinomas are one of the most difficult cancers to treat and have a poor prognosis. Therefore, further basic research on this tumor type is needed to find new therapeutic approaches also on the molecular level.

It is assumed that hyaluronic acid has a growth and proliferation promoting effect in tumorigenesis. There is a direct correlation between patient survival rate and increased hyaluronic acid content. Similarly, increased transcription of hyaluronic acid synthases (HAS1-3) has been shown to be indicative of a poorer prognosis in colon cancer. Downregulation of HAS isoforms in prostate cancer leads to inhibition of tumor growth as well as vascularization. Hyaluronidases are already used in some tumor therapies. Hyaluronan is also important for metastasis and cytostatic resistance.

4-Methylumbelliferone (4MU) inhibits HAS1-3, and it is already being used as a bile duct therapeutic and to treat elevated glycosaminoglycan levels. *In vivo* rodent experiments showed a success of 4MU in the treatment of melanoma.

Dichloroacetic acid (DCA) inhibits anaerobic glycolysis by activating pyruvate dehydrogenase in mitochondria, which is inactivated in many tumor cells. Therefore, it exhibits selective effects on tumor cells. This reactivation leads to an activation of mitochondrial apoptosis pathways and causes tumor cell demise.

Preliminary experiments *in vitro* have demonstrated a synergistic inhibition effect of 4MU and DCA on cancer cell proliferation and growth.

Therefore, the aim of this work is to investigate the synergistic effect of the two compounds *in vivo* using a xenograft nude mouse model with esophageal cancer cells and to confirm the synergism previously seen *in vitro*.

The results of this work show that the combination therapy can achieve stagnation of tumor growth, reduction of proliferation rate, increased apoptosis, and decreased neoangiogenesis.

Abkürzungsverzeichnis

4MU	4-Methylumbelliferon
AC	Adenokarzinom (<i>Adenocarcinoma</i>)
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CK	Zytokeratin
c-Met	<i>Tyrosine-protein kinase Met</i>
CoA	Coenzym A
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DCA	Dichloracetat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ESCC	Plattenepithelkarzinom (<i>esophageal squamous cell carcinoma</i>)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
HA	Hyaluronsäure (<i>hyaluronic acid</i>)
HAS	Hyaluronsäure-Synthase (<i>hyaluronic acid synthase</i>)
HCl	Salzsäure
HYAL	Hyaluronidase
LYVE	<i>lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
MCT1	Monocarboxylat-Transporter 1
MPC	Mitochondrialer Pyruvat-Carrier
mROS	Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (<i>mitochondrial reactive oxygen species</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphat- buffered saline</i>)
PDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (<i>pyruvat dehydrogenase complex</i>)
PDK	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase
RHAMM	<i>receptor for hyaluronan mediated motility</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TIF	<i>Tagged Image File</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
UDP	Uridindiphosphat
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

<i>Zusammenfassung</i>	<i>I</i>
<i>Summary</i>	<i>II</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>III</i>
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>VII</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
1 Einleitung	9
1.1 Das Ösophaguskarzinom	9
1.1.1 Epidemiologie und Prognose	9
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	9
1.1.3 Therapie	9
1.2 Warburg-Effekt	10
1.2.1 Definition und Bedeutung	10
1.3 Apoptose	11
1.3.1 Extrinsischer Weg der Apoptose	11
1.3.2 Intrinsischer Weg der Apoptose	11
1.4 Mitochondrien-Reaktivierung durch Dichloracetat	11
1.4.1 Struktur und Vorkommen	11
1.4.2 Wirkungsweise und Nebenwirkungen	12
1.5 Hyaluronsäure-System	14
1.5.1 Struktur, Vorkommen und Funktion	14
1.5.2 Bedeutung der Hyaluronsäure in Tumorgeweben	14
1.6 Inhibition der Hyaluronsäure-Synthese durch 4-Methyl- Umbelliferon	15
1.6.1 Aufbau und Wirkungsweise	15
1.6.2 Anwendung	16
1.7 Einfluss der Kombinationstherapie bestehend aus DCA und 4MU auf die Tumorprogression	16
1.8 Ziele dieser Arbeit	17
2 Materialien und Methoden	18
2.1 Crl:NU-Foxn1^{nu} Mäuse	18
2.2 Futtermittel	18
2.3 Trinkwasser	19
2.4 Kyse 410-Zellen	19
2.5 Reagenzien und Substanzen	19
2.6 Puffer und Lösungen	20

2.7	Antikörper und TUNEL-Kit	21
2.8	Geräte und Materialien	22
2.9	Nacktmaus-Xenograft-Modell und Gruppen	23
	2.9.1 4MU-Versuch	24
	2.9.2 DCA-Versuch	24
	2.9.3 DCA und 4MU-Kombinationsversuch	24
	2.9.4 Kontrollgruppe	24
2.10	Gewebeentnahme und Gewebeaufarbeitung	25
2.11	Erstellen von Kryostatschnitten	25
2.12	Färbungen und immunhistochemische Färbungen	25
	2.12.1 Hämalaun-Eosin-Färbung	25
	2.12.2 TUNEL-Färbung	26
	2.12.3 Ki67-Färbung	27
	2.12.4 CD31-Färbung	28
	2.12.5 HA-CK18-Färbung	29
2.13	Auswertung der Hämalaun-Eosin-Färbung	30
2.14	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	30
	2.14.1 Auswertung der Ki67-Färbung	30
	2.14.2 Auswertung der TUNEL-Färbung	31
	2.14.3 Auswertung der CD31-Färbung	31
	2.14.4 HA-CK18-Färbung	32
2.15	Statistik	32
3	<i>Ergebnisse</i>	33
3.1	Einfluss der Prüfsubstanzen auf das Wachstum der Tumorzellen ...	33
3.2	Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Tumorzellmorphologie	34
	36	
3.3	Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Apoptose der Tumorzellen	38
3.4	Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Proliferationsrate der Tumorzellen	39
3.5	Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Vaskularisierung im Tumorgewebe	40
3.6	Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Hyaluronsäurekonzentration im Tumorgewebe	41
4	<i>Diskussion</i>	42
4.1	Einfluss einer Kombinationstherapie mit DCA und 4MU auf das Wachstum der Tumorzellen	42
4.2	Einfluss der Kombinationstherapie auf die HA-Konzentration im Tumorgewebe	43
4.3	Einfluss der Kombinationstherapie auf die Apoptose der Tumorzellen	44
4.4	Einfluss der Kombinationstherapie auf die Proliferation der Tumorzellen	45

4.5	Einfluss der Kombinationstherapie auf die Vaskularisierung im Tumorgewebe	45
4.6	Ausblick.....	46
5	<i>Schlussfolgerung</i>	48
	<i>Literaturverzeichnis</i>	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendetes Futter für Crl:NU-Foxn1 ^{nu} Nacktmäuse.....	18
Tabelle 2 Verwendete Reagenzien und Substanzen.....	19
Tabelle 3 Verwendete Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 4 Antikörper der immunhistochemischen Färbungen und TUNEL-Kit.....	21
Tabelle 5 Verwendete Geräte und Materialien.....	22

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Wirkungsweise von DCA und 4MU	13
Abbildung 2 Tumorwachstum unter Behandlung mit 4MU und DCA	33
Abbildung 3 Übersichtsaufnahme zur Beurteilung morphologischer Veränderungen der Tumorzellen sowie des Tumorzellstromas unter Verabreichung von DCA und 4MU ..	35
Abbildung 4 Detailaufnahmen zur Beurteilung morphologischer Veränderungen der Tumorzellen sowie des Tumorzellstromas unter Verabreichung von DCA und 4MU ..	36
Abbildung 5 Apoptoserate (Tunel-Färbung) in ösophagealen Tumorzellen unter Behandlung mit 4MU und DCA.....	38
Abbildung 6 Proliferation (Ki67-Färbung) in ösophagealen Tumorzellen unter Behandlung mit 4MU und DCA.....	39
Abbildung 7 Angiogenese (CD31-Färbung) in ösophagealen Tumorzellen unter Behandlung mit 4MU und DCA.....	40
Abbildung 8 HA und Cytokeratin 18 (CK18) in ösophagealen Tumorschnitten unter Behandlung mit 4MU und DCA.....	41

1 Einleitung

1.1 Das Ösophaguskarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Prognose

Beim Ösophaguskarzinom handelt es sich um die acht-häufigste Tumorerkrankung weltweit. Die Prognose ist mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von 15 % bis 25 % sehr schlecht. Trotz verschiedener Therapieregimes, wie beispielsweise neoadjuvante Chemotherapie und Operation, liegt das Ösophaguskarzinom in der Krebstodesstatistik auf Platz sechs. Ein Grund hierfür ist unter anderem das aggressive Wachstum und die meist späte Diagnosestellung[1].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Histologisch lässt sich das Ösophaguskarzinom in Adenokarzinome (AC) und Plattenepithelkarzinome (ESCC) unterteilen. Seltenerer Unterformen stellen beispielsweise Melanome oder Leiomyosarkome dar[2]. Zwar kommen Adeno- und Plattenepithelkarzinome etwa gleich häufig vor, unterscheiden sich jedoch sowohl in ihren Risikofaktoren als auch ihrer Lokalisation. Während Plattenepithelkarzinome des Ösophagus in jedem Abschnitt auftreten können und als Risikofaktoren vornehmlich Alkohol und Nikotinabusus gelten, kommen Adenokarzinome hauptsächlich im distalen Ösophagus vor und entstehen meist über sogenannte Präkanzerosen (Barrett-Ösophagus)[1].

1.1.3 Therapie

Aktuell beinhaltet die Standardtherapie des Ösophaguskarzinoms ein multimodales Therapiekonzept, welches je nach Tumorstadium aus neoadjuvanter Radiochemotherapie, operativer Resektion inklusive Lymphknotendisektion und adjuvanter Chemotherapie bestehen kann. Abhängig von der histologischen Differenzierung des Tumors können hier beispielsweise Cisplatin, Fluorouracil oder Taxane eingesetzt werden. Ist eine kurative Resektion des Tumors nicht möglich, kommt eine palliative Behandlung zur Linderung der Beschwerden, wie beispielsweise

Dysphagie in Betracht. Diese kann aus lokalen Bestrahlungen, endoskopischen Stentimplantationen oder Chemotherapie bestehen[1, 3].

Aufgrund der eingangs erwähnten schlechten Prognose und geringen 5-Jahres-Überlebensrate, ist das Ösophaguskarzinom, seine molekularen Entstehungs- und Resistenzmechanismen und vor allem die Therapie interessant für die Erforschung neuer Therapieansätze auch auf molekularer Ebene.

1.2 Warburg-Effekt

1.2.1 Definition und Bedeutung

Der Warburg-Effekt wurde erstmals von Nobelpreisträger Otto Warburg entdeckt und beschreibt den in vielen Tumorzellen vorzufindenden metabolischen Wechsel von der oxidativen Phosphorylierung zur aeroben Glykolyse[4]. Hierbei kommt es zu einer reduzierten Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC), welcher den Transport von Pyruvat in die Mitochondrien steuert[5]. Um die nun verminderte ATP-Synthese durch die mitochondriengebundene oxidative Phosphorylierung zu kompensieren, entsteht eine gesteigerte Glykolyse gefolgt von einer vermehrten Laktatbildung (Abbildung 1). Obwohl die Energiehomöostase der wachsenden Tumorzelle durch diesen Prozess beeinträchtigt wird, scheinen die Vorteile zu überwiegen. So kommt es zur Akkumulation von Metaboliten, wie beispielsweise Pyruvat, welches zur Generierung von Biomasse (Aminosäuren, Lipide etc.) und letztendlich von neuen Tochterzellen genutzt werden kann[5]. Auch resultiert durch die Inaktivierung der Mitochondrien eine geringere Bildung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (mROS), was zu einer verminderten Apoptose der Tumorzelle führt[6]. Durch die gesteigerte Konzentration an Laktat scheint zudem eine Filialisierung begünstigt zu werden[6].

1.3 Apoptose

1.3.1 Extrinsischer Weg der Apoptose

Die Apoptose, also der natürliche Zelltod, gliedert sich grob in einen extrinsischen und einen intrinsischen, durch Mitochondrien induzierten Weg. Beim extrinsischen Weg spielen Rezeptoren wie beispielsweise der TNF α -Rezeptor, der Fas-Rezeptor oder CD95 eine wichtige Rolle. Durch Bindung bestimmter Liganden an diese zellmembranständige Rezeptoren, kommt es zur Aktivierung von Signalkaskaden, welche letztendlich durch Aktivierung von Effektor-Caspasen wie Caspase 8 die Apoptose einleiten[7].

1.3.2 Intrinsischer Weg der Apoptose

Auslöser des intrinsischen, über die Mitochondrien eingeleiteten Weges können neben DNA-Schäden auch osmotischer Stress oder Entzug von Wachstumsfaktoren sein. So kann es beispielsweise durch DNA-Schäden im Rahmen von Tumorerkrankungen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 kommen, wodurch vermehrt sogenanntes Bad-Protein exprimiert wird. Dieses aktiviert wiederum Bax und Bak, welche als Heterodimer in der äußeren Mitochondrienmembran vorkommen. Nach Aktivierung von Bax/Bak kommt es vermutlich zur Porenbildung, worüber es zum Austritt von Cytochrom c ins Zellinnere kommt. Zeitgleich kommt es zur Ablösung von Apaf-1 von der Mitochondrienmembran. Cytochrom c, Apaf-1 und Caspase 9 lagern sich zu einem sogenannten Apoptosom zusammen und können Effektor-Caspasen aus dem extrinsischen Weg der Apoptose aktivieren und somit den programmierten Zelltod einleiten[7]. Ohne diese Funktionsfähigkeit der Mitochondrien, wie unter dem Warburg-Effekt zu beobachten, fehlt also ein wichtiger Apoptoseweg entarteter Zellen[6].

1.4 Mitochondrien-Reaktivierung durch Dichloracetat

1.4.1 Struktur und Vorkommen

Bei Dichloracetat (DCA) handelt es sich um ein Salz der Dichloressigsäure, eine chlorierte Carbonsäure, bei welcher zwei Wasserstoffatome der Methylgruppe durch

zwei Chloratome substituiert sind. DCA ist sowohl ein Nebenprodukt der Chlorierung von Wasser und Metabolit industrieller Lösungsmittel, als auch ein potenziell medizinisch wirksames Pharmakon. So wird seine Wirksamkeit bei der Behandlung genetisch bedingter mitochondrialer Stoffwechselerkrankungen, pulmonaler Hypertonie und Krebserkrankungen erforscht[8].

1.4.2 Wirkungsweise und Nebenwirkungen

DCA besitzt die Fähigkeit, die als Warburg-Effekt beschriebene aerobe Glykolyse in Tumorzellen, durch Dephosphorylierung der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK) und dadurch Reaktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC), wieder in eine oxydative Phosphorylierung zu überführen[9] (Abbildung 1). Versuche mit Zellkulturen und Tierexperimente zeigten eine starke Wirksamkeit gegen eine Vielzahl verschiedener Tumorentitäten. Diese beruhte hauptsächlich auf Apoptoseinduktion, gesteigerter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und verminderter Tumorzellproliferation[9]. In klinischen Studien zeigte sich der Effekt bislang jedoch nur begrenzt. Eine Schwierigkeit scheint darin zu bestehen, den Patienten die zum Wirkeintritt tatsächlich benötigte Dosis zu verabreichen. Ein Grund dafür sind Nebenwirkungen, wie beispielsweise Übelkeit und reversible Neuropathie. Höhere Dosen verstärkten die Nebenwirkungen, so dass eine Reduktion der verabreichten Menge erfolgen musste[10].

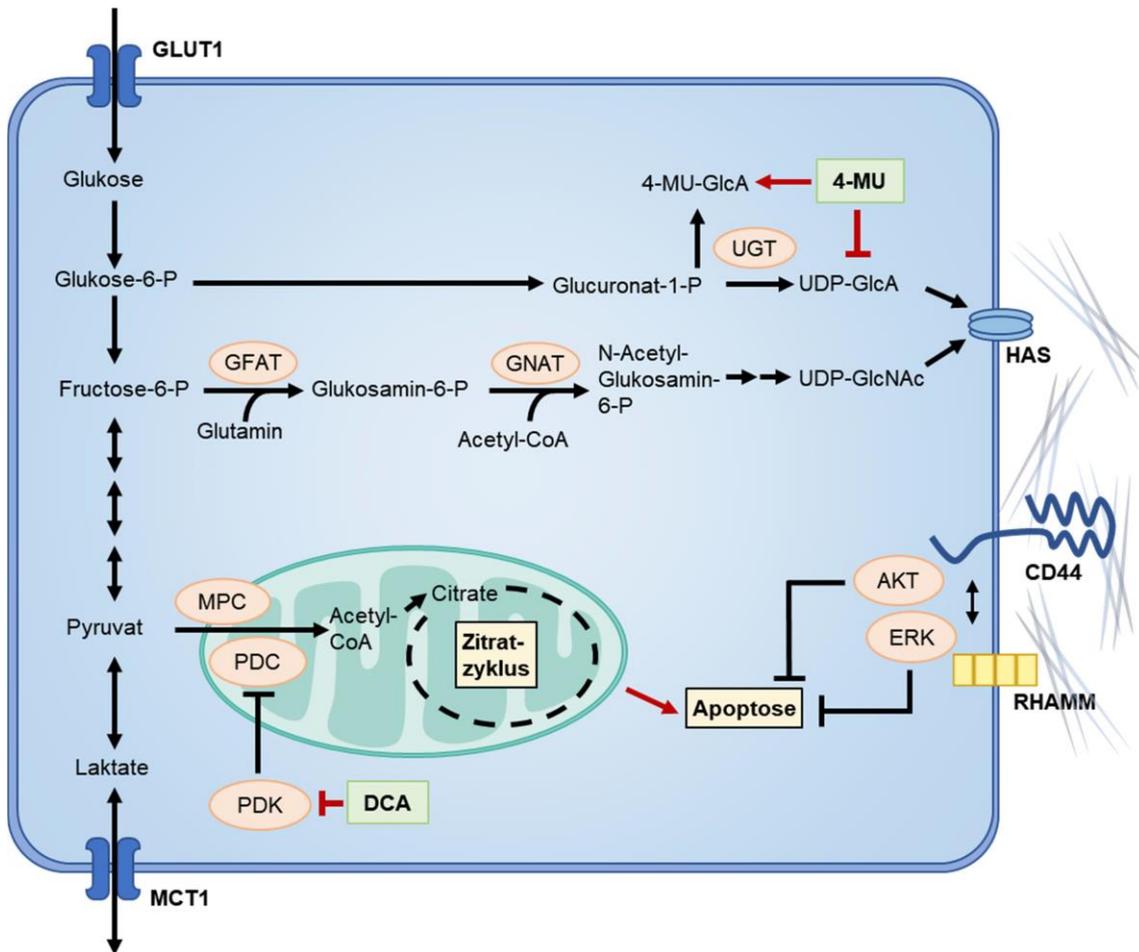


Abbildung 1 Wirkmechanismus von Dichloracetat (DCA) und 4-Methylumbelliferon (4MU), modifiziert nach[11]

Schematische Darstellung der Stoffwechselwege, die am Zusammenspiel von Glykolyse, mitochondrialer Atmung und der Synthese von Hyaluronsäure (HA) beteiligt sind. Die Aufnahme von Glukose erfolgt durch Glukosetransporter wie GLUT1. Im Rahmen der Glykolyse wird die Glukose dann weiter verstoffwechselt. Pyruvat wird über mitochondriale Pyruvat-Carrier (MPC) zur weiteren Energiegewinnung in die Mitochondrien transportiert. Hier erfolgt durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) die Umwandlung in Acetyl-CoA, welches für die ATP-Synthese benötigt wird. In den meisten Tumorzellen ist dieser Weg durch Hochregulierung der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK) gestört. PDK führt zu einer Blockierung der PDC-Aktivität. Dies wird Warburg-Effekt genannt. Es kommt alternativ zur Reduktion von Pyruvat zu Laktat, welches durch Monocarboxylat-Transporter (beispielsweise MCT1) ausgeschleust wird.

Dichloracetat (DCA) führt nun über eine Hemmung der PDK zur Wiederherstellung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und somit zur Reaktivierung der Mitochondrien und damit zu einer gesteigerten Apoptoserate.

Dieser Prozess führt aber auch zu einem Anstieg von Glucose-6-Phosphat und N-Acetyl-Glucosamin, die für die HA-Synthese benötigt werden. Es kommt letztendlich zu einem Anstieg der HA in der Extrazellulären Matrix. HA vermittelt über HA-Rezeptoren wie CD44 und RHAMM antiapoptotische Signale. 4-Methylumbelliferon (4MU) ist ein HA-Synthase-Inhibitor mit nachgewiesenen tumorprogressionshemmenden Eigenschaften durch verringerte HA-Bildung.

1.5 Hyaluronsäure-System

1.5.1 Struktur, Vorkommen und Funktion

Bei der HA handelt es sich um ein Polymer, welches bei allen Wirbeltieren vorkommt. HA spielt nicht nur während der Embryogenese eine wichtige Rolle, sondern ist beispielsweise auch durch ihre Fähigkeit, Wasser und Ionen zu binden verantwortlich für die Hydratisierung von Geweben und ebenfalls in großen Teilen in der Haut zu finden, wo sie wichtig für die Hautelastizität ist. HA spielt jedoch nicht nur bei physiologisch raschem Gewebewachstum eine entscheidende Rolle, sondern ist auch in Tumorgewebe beispielsweise an der Tumorzellprogression beteiligt[12].

Hauptbestandteile der HA sind D-Glukuronsäure und D-N-Azetylglukosamin, welche im Wechsel zu einem langkettigen, unverzweigten Polysaccharid zusammengelagert sind. Zusammen mit Kollagen stellt HA den Großteil der Extrazellulären Matrix (EZM) dar. Die HA-Synthese erfolgt intrazellulär, durch drei membrangebundene Isoformen der HA-Synthase (HAS1-3), welche auch für die Ausschleusung der HA in die extrazelluläre Matrix verantwortlich sind[13].

Ebenso wie die Synthese der HA, erfolgt auch ihr Abbau enzymatisch. Verantwortlich hierfür sind Hyaluronidasen, welche ebenfalls in mehreren Isoformen vorkommen. Wichtige Vertreter sind HYAL1 und HYAL2. HYAL1 spaltet HA zu Di- und Tetrasacchariden. HYAL2 ist auf der Plasmamembran gelegen, baut HA zu 20 kDa großen Fragmenten ab und schleust diese in Lysosomen ein. Es kann folglich zwischen hochmolekularer und fragmentierter HA unterschieden werden, eine Tatsache, die auch entscheidend für die biologische Wirkung der HA ist[14].

1.5.2 Bedeutung der Hyaluronsäure in Tumorgewebe

Während hochmolekulare HA eine entscheidende Rolle bei der Gewebe-Hydratisierung und der Unterdrückung einer Immunreaktion und Angiogenese spielt, fördern die Fragmente der HA die Inflammation, Zellmigration und Neoangiogenese. Gleichzeitig unterdrücken sie die Apoptose von Tumorzellen[12, 14]. Eine weitere Funktion der HA in der extrazellulären Matrix von Tumorgewebe ist, dass durch eine vermehrte HA-

Bildung ein Schutzmantel entstehen kann, welcher als Schutzbarriere zu einer Chemotherapieresistenz führen kann[15].

Ebenso bedeutsam wie die HA, sind die Rezeptoren, an welche die HA binden und dadurch verschiedene Signalwege induzieren kann. Wichtige HA-Rezeptoren stellen CD44 (*cluster of differentiation*), RHAMM (*receptor for hyaluronan mediated motility*), LYVE (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor*) und TLR4 (*toll-like receptor 4*) dar[16]. CD44 wurde als einer der ersten HA-Rezeptoren entdeckt und ist, neben beispielsweise auf hämatopoetischen Stammzellen und Fibroblasten, insbesondere auf vielen Tumorzellen vertreten[17]. Die Bindung von HA der extrazellulären Matrix an den Rezeptor führt zur Zell-Adhäsion und stimuliert über verschiedene Signalwege die Aggregation, Proliferation, Migration und Angiogenese. So wird auch eine direkte Assoziation zwischen der intrazellulären Domäne von CD44 und dem Zytoskelett vermutet[16, 18-21]. Doch auch die Apoptose wird durch Bindung von HA beeinflusst. So kommt es bei Bindung von HA an CD44 zur Aktivierung verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen wie EGFR oder c-Met welche wiederum die antiapoptotisch wirkenden PI3K/AKT- und MAPK/ERK-Signalwege aktivieren[22]. RHAMM findet sich im Gegensatz zu CD44 nicht nur auf der Oberfläche von Zellen, sondern auch im Zellinneren, wie beispielsweise auf den Mitochondrien[23]. Wie auch DC44 steht RHAMM in Interaktion mit dem Zytoskelett und spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellmotilität[24].

1.6 Inhibition der Hyaluronsäure-Synthese durch 4-Methyl-Umbelliferon

1.6.1 Aufbau und Wirkungsweise

4-Methyl-Umbelliferon (4MU) ist ein niedermolekulares Kumarin-Derivat und inhibiert die HA-Synthese. Wie bereits erwähnt entsteht HA aus den Vorstufen Uridindiphosphat-N-Azetylglukosamin (UDP) und UDP-Glukuronsäure. 4MU wird durch eine UDP-Transferase anstelle des UDP mit der Glukuronsäure verknüpft, so dass 4MU-Glukuronsäure entsteht. Hierdurch steht intrazellulär weniger Substrat zur HA-Synthese zur Verfügung[25].

1.6.2 Anwendung

4-Methyl-Umbelliferon ist oral verfügbar und wurde bereits therapeutisch eingesetzt. In den frühen achtziger Jahren war es in Deutschland zur symptomatischen Therapie von Gallenwegs-Koliken zugelassen, da es eine spasmolytische Wirkung besitzt und war bis 2015 im Handel. Die Dosierung von 4MU ist zwar mit 1200 mg recht hoch, dennoch sind die Nebenwirkungen gering. Es können sehr selten Diarrhoen, Obstipation oder Überempfindlichkeitsreaktionen auftreten, die sich als Hautveränderungen äußern können[26]. Im Bereich der Tumorthherapie wurde 4MU in der Vergangenheit bereits mehrfach *in vitro* und im Tiermodell untersucht. So wurde beispielsweise seine Wirkung als Adjuvans in Kombination mit Gemcitabin im Mausmodell mit humanen Pankreaskarzinomzellen getestet. Hier wurde vermutet, dass es unter dieser Therapie zu einer Reduktion des HA-Gehaltes in der extrazellulären Matrix und somit zu einem besseren Ansprechen der Chemotherapie kommt[27]. Somit kann HA eine gewisse protektive Funktion für Tumorzellen zugeschrieben werden. In Ösophaguskarzinomzellen führte 4MU *in vitro* zu einer geringeren Proliferation und zu einem Umbau im Stroma[28]. Auch zeigten *in vivo* Versuche eine durch 4MU induzierte Apoptose beim Prostatakarzinom[29] und eine verminderte Filialisierung von Melanomzellen[30].

1.7 Einfluss der Kombinationstherapie bestehend aus DCA und 4MU auf die Tumorprogression

Wie bereits erwähnt, spielt sowohl der Warburg-Effekt als auch eine exzessive HA-Produktion eine wichtige Rolle bei Tumorerkrankungen. Das im Rahmen der aeroben Glykolyse anfallende Laktat in den Tumorzellen wirkt nicht nur begünstigend auf die Metastasierung, sondern stimuliert auch zusätzlich die Synthese von HA (durch HAS1-3), welche dann in die extrazelluläre Matrix gelangt[6, 31]. Dieser Effekt kann durch die alleinige, durch Nebenwirkungen limitierte Gabe von DCA und damit Reaktivierung der Mitochondrien und der oxidativen Phosphorylierung nicht genügend beeinflusst werden. In *in vitro* Untersuchungen zeigten sich Hinweise, dass Tumorzellen unter Behandlung mit DCA sogar vermehrt HA synthetisieren[11]. HA sendet über Bindung an CD44 und RHAMM zusätzlich antiapoptotische Signale ins Zellinnere (Abbildung 1), wodurch die mitochondrial initiierte Apoptose-Kaskade unterdrückt wird[15]. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, könnte eine zusätzliche Verabreichung von 4MU zur

Reduktion der HA-Synthese erfolgen. Durch Inhibition der HA-Synthese und der damit verbundenen reduzierten HA-Bildung und Menge könnte DCA auch in geringeren Dosen einen therapeutischen Effekt zeigen und zur gesteigerten Apoptose der Tumorzellen führen. Die Kombinationstumortherapie bestehend aus 4MU und DCA ist im Mausmodell noch nicht untersucht worden und könnte eine interessante, für Tumorzellen selektive und nebenwirkungsarme Therapieoption sein. Diese Hypothese der synergistischen Wirksamkeit von DCA und 4MU auf die Tumorprogression wird daher in dieser Arbeit durch verschiedene Messungen und die Analyse spezifischer immunhistochemischer Färbungen genauer untersucht.

1.8 Ziele dieser Arbeit

Sowohl der Warburg-Effekt als auch die HA spielen eine wichtige Rolle bei Tumorerkrankungen. Bereits *in vitro* Vorversuche zeigen Hinweise auf eine synergistische Wirkung zwischen diesen beiden, welche auch einen Einfluss auf die Therapie haben könnte.

Die Ziele dieser Arbeit sind daher die Untersuchung des Einflusses der Kombinationstumortherapie bestehend aus DCA und 4MU im Vergleich zur Monotherapie und Placebo auf:

1. Die Tumorprogression
2. Die Tumorzellmorphologie
3. Die Apoptoserate der Tumorzellen
4. Die Proliferationsrate der Tumorzellen
5. Die Tumervaskularisierung
6. Den HA-Gehalt

2 Materialien und Methoden

2.1 Crl:NU-Foxn1^{nu} Mäuse

Für die Versuche wurden 8 Wochen alte, ca. 30 g schwere T-Zell-immundefiziente, männliche Crl:NU-Foxn1^{nu} Nacktmäuse verwendet, welche eigens für Tierversuche in den Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) gezüchtet werden.

Bei dieser speziellen Züchtung handelt es sich um Tiere, bei welchen es im Rahmen der embryonalen Entwicklung durch eine Deletion im Foxn1-Gens zu einer Aplasie des Thymus kommt. Hierdurch weisen die Mäuse eine sehr geringe Anzahl an reifen T-Lymphozyten auf und es kommt zu einer verringerten T-Zell-abhängigen Immunantwort. Da T-Lymphozyten maßgeblich an der Bekämpfung körperfremder Strukturen beteiligt sind, kommt es bei einem Mangel folglich nicht zu einer Abstoßungsreaktion subkutan applizierter Xenograft-Zellen.

Des Weiteren kommt es im Rahmen der Mutation zu einem verminderten Fellwachstum, aufgrund dessen die Nacktmäuse ihren Namen erhalten haben.

2.2 Futtermittel

Tabelle 1 Verwendetes Futter für Crl:NU-Foxn1^{nu} Nacktmäuse

Bezeichnung	Hersteller
ssniff NM Extrudat <i>Complete feed for nude mice-breeding and maintenance</i>	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland [32]
4MU als Zusatzstoff für die 4MU-Interventionsgruppen	AlfaAesar, München

2.3 Trinkwasser

Die Tiere haben in ausreichender Menge entkeimtes Wasser erhalten. In den entsprechenden Interventionsgruppen wurde das Wasser mit DCA versetzt. Eine Crl:NU-Foxn1^{nu} Nacktmaus trinkt ca. 4,5 ml Wasser am Tag.

2.4 Kyse 410-Zellen

Bei den verwendeten Kyse 410-Zellen (DSMZ, Braunschweig), handelt es sich um Zellen einer humanen Ösophaguskarzinom-Zellreihe (Plattenepithelkarzinom). Es handelt sich hierbei um eine männliche Zellreihe, die Zellteilungszeit beträgt ca. 45 Stunden. Humane Kyse 410-Zellen finden sowohl bei *in vitro* als auch bei *in vivo* Experimenten Verwendung. Es wurde beobachtet, dass Kyse 410-Zellen, nachdem sie Crl:NU-Foxn1^{nu} Mäusen subkutan im Bereich der Flanken appliziert wurden, lokal nach ca. 8 Wochen zu einem bis zu 30 mm³ messenden Tumor heran wuchsen[33]. Feingeweblich zeigen sich niedrig differenzierte, in kompakten Verbänden angeordnete Karzinomzellen.

2.5 Reagenzien und Substanzen

Tabelle 2 Verwendete Reagenzien und Substanzen

Substanz	Hersteller
Azeton $\geq 99,5\%$ zur Synthese	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland LOT: 425234935
Avidin-Biotin-Block	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA, LOT: ABB130724
Deionisiertes Wasser	Milli-Q/Millipore, Biocel, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin Y, Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA LOT: MKBG4746V
Ethanol $\geq 99,8\%$ absolut	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland LOT: 465236597

Formaldehyd 10%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland LOT: 092183863
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland LOT: 171171289
HCl (Salzsäure) 10%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland LOT: 401177782
Hoechst 33324 (Trihydrochloride), Invitrogen	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA LOT: 25824W
RotiClear	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland LOT: 146241872
RotiMount, Xylol- und Toluolfreies Eindeckmedium	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, Deutschland LOT: 335233179
RotiMount FluoCare DAPI	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland LOT: 414220451
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, CA, USA, LOT: ZA1222

2.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 3 Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
Blockierungs-Puffer	1 x PBS 1 % (w/v) BSA (Bovines Serumalbumin) 10 % FCS
Bovines Serumalbumin (BSA)	1 % BSA in 1 x PBS
1x <i>phosphat-buffered saline</i> (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,3 mM Na ₂ HPO ₄

	pH 7,4
Ethanol 70 % Ethanol 96 %	Von Ethanol absolut verdünnt mit <i>Aqua dest.</i>
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
4 % Formaldehyd/Formalin	Von 10 %iger Stocklösung verdünnt mit <i>Aqua dest.</i>
1 % HCl - Lösung	Von 10 %iger Stocklösung verdünnt mit <i>Aqua dest.</i>
10 x <i>tris-buffered saline</i> (TBS)	Tris 24,2 g NaCl 80,8 g <i>Aqua dest.</i> 1 l pH 7,6
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA LOT: 67H0044

2.7 Antikörper und TUNEL-Kit

Tabelle 4 Antikörper der immunhistochemischen Färbungen und TUNEL-Kit

Färbung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
HA	HA-Bindeprotein (HABP), biotinyliert Firma: Calbiochem, Merk, Darmstadt, Deutschland LOT: 159600	Streptavidin Cy3 Firma: Caltag Buckingham, UK LOT: 0200B
CK18	<i>guinea pig polyclonal anti CK18</i> Firma: Progen, Heidelberg, Deutschland LOT: 311181	<i>goat anti guinea pig FITC IgG (H+L)</i> Firma Jackson Immuno Research, West Grove PA USA LOT: 76840

CD31	rat anti-CD31 ab7388 Firma: Abcam, Cambridge, UK LOT: GR738361	Anti rat rhodamine red x Firma: Jackson Immuno Research, West Grove PA, USA LOT: 124109974
KI67	rabbit anti-Ki67 Novus Firma: Novus, Littleton, USA LOT: G011	goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 Firma: Abcam, Cambridge, UK LOT: 1504529

Für die TUNEL-Färbung wurde das *Click-iT Plus TUNEL Assay for in situ apoptosis detection with Alexa Fluor dyes* von life technologies (Carlsbad, CA, USA) benutzt[34].

2.8 Geräte und Materialien

Tabelle 5 Verwendete Geräte und Materialien

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Deckgläschen	<i>Cover Slips</i>	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde Deutschland
Einbettmedium für Gefrierschnitte	KP-CryoCompound	Klinipath BV AD, Duiven Niederlande LOT: 0801151620C
Fettstift	Liquid Blocker	Diado Sangyo Co Tokyo, Japan
Fluoreszenz-Mikroskop inkl. Kamera und Software	Axio Imager M2, Axio-Cam HRC, AxioVision Release 4.8.1 (11-2009)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Gefrierschrank	Forma 900 Series	Thermo Scientific Waltham, MA, USA

Kryokästen	<i>Disposable Base Mold</i>	Elution Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA
Kryostat	Leica CM3050S Leica CM1850	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Nagellack	Essence	Cosnova GmbH, Sulzbach, Deutschland
Objektträger	Super Frost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Pipetten & Pipettenspitzen		Eppendorf, Hamburg
Silica Gel	Silica Gel Orange, 2-5mm mit Indikator	Carl Roth GmbH und Co. Karlsruhe, Deutschland LOT: 505237168
Wasserbad	Typ 1004	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Deutschland
Zentrifuge	Mini Spin plus	Eppendorf, Hamburg

2.9 Nacktmaus-Xenograft-Modell und Gruppen

Der praktische Teil dieser Arbeit begann für mich mit der Weiterverarbeitung der entnommenen Tumore, dem Schneiden am Kryostaten, da ich keinen Tierversuchsschein habe. Zum Verständnis und der Vollständigkeit halber nehme ich die von Herrn PD Dr. med. Dr. rer.nat. Sören Twarock vorgeschalteten Versuchsabläufe und Arbeiten an den Tieren in meine Dissertation mit auf.

Vor der Durchführung der Tierversuche wurde ordnungsgemäß ein Antrag gestellt und vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz in NRW unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2013.A472 genehmigt. Die Experimente wurden an der Heinrich-Heine-Universität in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) durchgeführt. Den ca. 8 Wochen alten Tieren wurden initial ca. 10^6 Tumorzellen der Linie KYSE-410 in 200 μ l PBS subkutan im Bereich der

Flanken appliziert. Es erfolgten regelmäßige Kontrollen des Tumorwachstums (alle 5 Tage), sowie Messung des Tumolvolumens mittels Schieblehre. Sobald die Tumore ein Volumen von mehr als 30 mm³ erreicht hatten, wurden die Tiere randomisiert in vier Gruppen eingeteilt und in den drei Interventionsgruppen mit der Gabe der entsprechenden Substanzen begonnen. Nach 60 Tagen und weiteren regelmäßigen Tumormessungen wurden die Versuchsarbeiten durch Behandlung der Tiere mit einer CO₂ angereicherte Atmosphäre beendet und anschließend die Tumore zur histologischen und immunhistologischen Untersuchung entnommen.

2.9.1 4MU-Versuch

Die Tiere dieser Interventionsgruppe wurden 60 Tage mit 4MU versetztem Futter gefüttert. Es wurden 50 mg 4MU pro g Futter beigefügt. Es wurde in ausreichender Menge angeboten, so dass jede Maus mit ihrer täglichen Essensmenge (ca. 4,5 g pro Tag) durchschnittlich 225 mg 4MU pro Tag aufnahm.

2.9.2 DCA-Versuch

Das Trinkwasser der Tiere dieser Interventionsgruppe wurde 60 Tage mit DCA (75 mg DCA pro l Trinkwasser) versetzt. Die durchschnittliche Trinkmenge pro Maus betrug ca. 4,5 ml, so dass ca. 6,8 mg DCA pro Tag zugeführt wurden.

2.9.3 DCA und 4MU-Kombinationsversuch

Den Tieren dieser Gruppe wurden analog der beiden Einzelgruppen die beiden Substanzen parallel verabreicht.

2.9.4 Kontrollgruppe

Die Tiere dieser Gruppe haben ausschließlich unbehandeltes Futter und Trinkwasser erhalten.

2.10 Gewebeentnahme und Gewebeaufarbeitung

Die Entnahme der Tumore erfolgte nach Euthanasie der Tiere. Das entnommene Gewebe wurde in mit speziellem Einbettmedium für Kryoschnitte gefüllte Kryoformen gegeben und durch Isopentan bei -40 °C gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C .

2.11 Erstellen von Kryostatschnitten

Zum Erstellen der Gefrierschnitte wurde ein Kryostat verwendet. Die bei -80 °C gelagerten Tumore wurden vor der Weiterverarbeitung im Inneren des Kryostaten auf -20 °C erwärmt. Die eingebetteten Tumore wurden mit TissueTek auf gekühlte Kryostempel gegeben und somit durch Anfrieren fixiert. Der Stempel konnte so anschließend mit dem Gewebe im Schneideblock eingespannt und die Tumore bei -23 °C geschnitten werden.

Als optimale Schnittdicke wurde $8\text{ }\mu\text{m}$ festgelegt. Es wurden pro Tumor 40 Konsekutivschnitte angefertigt, wobei immer zwei Schnitte auf einen bei Raumtemperatur gelagerten Objektträger aufgezogen wurden. Gelagert wurden die Schnitte bei -80 °C in speziellen Lagerungsboxen. Zum Schutz vor Feuchtigkeit wurden den Boxen Beutelchen mit Silica Gel beigelegt. Vor Weiterverarbeitung wurden die benötigten Schnitte ohne zu kondensieren mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur erwärmt.

2.12 Färbungen und immunhistochemische Färbungen

Vor jeder Färbung wurden an ausgewählten Schnitten aller Gruppen Testfärbungen durchgeführt.

2.12.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung, mit welcher sich beispielsweise die Morphologie von Zellen sowie das Kern-Zytoplasma-Verhältnis oder auch bindegewebige Strukturen im Extrazellularraum beurteilen lassen.

Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte fixiert. Dies geschah durch 15 minütiges Eintauchen der Schnitte in eine Küvette mit 10 %igem Formalin bei 4 °C im Kühlschrank. Nach 2 mal 5 minütigem Waschen mit 1xPBS konnte die eigentliche Färbung durchgeführt werden.

Zunächst wurden die Objektträger in eine Küvette gegeben und eine Minute lang mit Aqua dest. bedeckt. Anschließend wurden die sauren, basophilen Strukturen der Zellen wie beispielsweise die DNA der Zellkerne mit dem basischen Farbstoff Hämalaun eingefärbt. Hierzu wurden die Schnitte ebenfalls eine Minute lang mit dem Farbstoff bedeckt. Als nächstes wurden die Schnitte zuerst kurz mit Leitungswasser und anschließend mit 1 % HCl bedeckt. Dann wurden die Schnitte 5 Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Durch diese pH-Wert-Erhöhung erhalten die gefärbten Strukturen ihre typische blau-violette-Färbung. Als letztes wurden die basischen, eosinophilen Strukturen der Zellen, wie beispielsweise das Zytoplasma gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte eine Minute lang mit 1 % Eosin bedeckt.

Als letztes erfolgte die Eindeckung der Schnitte. Die Schnitte wurden jeweils 2 Minuten mit 70 %igem Ethanol, 95 %igem Ethanol und Ethanol absolut entwässert (aufsteigende Alkoholreihe). Zum Schluss wurden die Schnitte 5 Minuten mit RotiClear bedeckt, bevor sie mit zwei Tropfen Roti Mount und einem Deckgläschen eingedeckt wurden.

2.12.2 TUNEL-Färbung

Bei der Click-iT Plus TUNEL-Färbung handelt es sich um ein fertiges Kit, mit welchem sich durch Apoptose fragmentierte DNA nachweisen lässt. Es wird ein EdUTP genutzt, dies ist ein dUTP (Deoxyuridintriphosphat), welches durch ein bioorthogonales Alkin modifiziert wurde. Dieses EdUTP wird am 3'Ende fragmentierter DNA durch das Enzym TdT (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase) eingebaut. Die Detektion erfolgt durch eine sogenannte Click-Reaktion[34]. Hierbei katalysiert Kupfer eine kovalente Reaktion zwischen dem verwendeten Farbstoff und dem Alkin. Auf Grund der kleinen Größe des Alkinteils, wird das EdUTP-Nukleotid schneller durch TdT eingebaut als andere modifizierte Nukleotide.

Als erster Schritt erfolgte die Gewebefixierung der Schnitte mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) im Wasserbad bei 37 °C für 15 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte 2

mal 5 Minuten mit PBS gewaschen und nach dem Trockenwischen der Objektträger um die Gewebeschnitte herum, sowie dem Umranden mit Fettstift, mit Proteinase K bedeckt und zum Inkubieren für 15 Minuten in eine feuchte Kammer gegeben. Danach wurden die Schnitte erneut 5 Minuten mit PBS gewaschen, für weitere 5 Minuten bei 37 °C in 4 %igem PFA fixiert, wieder 2 mal 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend in deionisiertem Wasser gespült.

Um eine Positivkontrolle als Referenz zu haben, wurde ein Schnitt für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 1U DNase 1 behandelt und mit desionisiertem Wasser gewaschen. DNase 1 ist ein Enzym, das DNA zerschneidet, so erhält man ausreichend freie 3'-Enden.

Als nächstes wurde die TdT-Reaktion durchgeführt. Hierfür wurden 100 µl frisch angesetzter *Reaction Buffer (Component A)* auf jeden Schnitt gegeben und 10 Minuten bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Durch Abschütteln wurde der *Reaction Buffer* entfernt und 50 µl zuvor angesetzte *TdT-Reaction Mixture* auf die Schnitte gegeben und 60 Minuten bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Spülen in deionisiertem Wasser, 5-minütigem Waschen in einer Lösung aus 0,1 % Triton X-100 und 3 % BSA in PBS und erneutem Spülen in PBS beendet.

Jetzt konnte die eigentliche Click-iT Plus-Reaktion stattfinden. Dafür wurde ein spezieller *Supermix* nach einer im Kit enthaltenen Anleitung frisch angefertigt und

50 µl dieses *Reaction Cocktails* auf jeden Schnitt gegeben. Die Schnitte wurden dann 30 Minuten bei 37 °C lichtgeschützt in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde einmal für 5 Minuten mit 3 % BSA in PBS und ein mal 5 Minuten in PBS gewaschen.

Als letztes wurden die Schnitte mit zwei Tropfen RotiMount FluoCare DAPI und einem Deckgläschen eingedeckt.

2.12.3 Ki67-Färbung

Bei dieser Färbung handelt es sich um eine immunhistochemische Fluoreszenz-Färbung. Hier erfolgt der Nachweis von Ki67, einem Protein, welches ausschließlich in der Interphase von sich teilenden Zellen nachweisbar ist, und somit als Proliferationsmarker genutzt werden kann. Nachdem die Schnitte ca. eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut wurden ohne zu beschlagen, wurden sie in eine Küvette

gegeben und bei 4 °C 10 Minuten in Aceton fixiert. Anschließend wurden sie 3 mal 5 Minuten mit 1xPBS gewaschen und eine Stunde lang mit Blockierlösung (10 % 10 x TBS und 10 % FCS und 1 % BSA) behandelt.

Als nächstes wurden 40 µl des Primärantikörpers *rabbit anti-Ki67 Novus* auf den oberen der beiden Schnitte auf dem Objektträger gegeben. Der untere Schnitt wurde als Negativkontrolle verwendet. Hierfür wurden 40 µl einer Lösung bestehend aus 1x PBS mit 1 % BSA aufgetragen. Der Antikörper wurde 1:100 in dieser Lösung verdünnt. Um ein Verlaufen des Antikörpers sowie ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern wurden die Objektträger mit fusselfreien Zellstofftüchern vorsichtig um die Schnitte herum getrocknet und die Schnitte mit speziellem Fettstift umrandet.

Die Inkubation des Antikörpers fand in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht statt und wurde mit einem dreimal fünfminütigem Waschen in PBS beendet. Im nächsten Schritt wurden 40 µl des Sekundärantikörpers *goat anti-rabbit Alexa Fluor568* 1:200 verdünnt mit PBS auf beide Schnitte des Objektträgers gegeben und eine Stunde in der dunklen, feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hier wurde die Inkubation mit 3 mal 5 Minuten Waschen in PBS in einer mit Alufolie abgedunkelten Küvette beendet.

Als letzter Schritt erfolgt die Färbung der Kerne mit Hoechst 33342 (1:20000 verdünnt in 1 x PBS) für 2 Minuten. Hoechst färbt durch Interkalierung doppelsträngige DNA an. Die Schnitte wurden ein letztes mal 5 Minuten mit PBS gewaschen und mit zwei Tropfen *Vectashield Antifade Mounting Medium* und einem Deckgläschen eingedeckt.

2.12.4 CD31-Färbung

Bei der CD31-Färbung handelt es sich ebenfalls um eine immunhistochemische Färbung, bei welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper eingesetzt werden. CD31 ist ein endothelialer Marker, der einen Überblick über die Vaskularisierung in Geweben gibt. Die CD31-Färbung ist in der Durchführung identisch mit der Ki67-Färbung. Es wurden jedoch andere Antikörper verwendet. Als Primärantikörper wurde *rat anti-CD31 (ab7388)* in einer 1:50 Verdünnung in einer Lösung bestehend aus 1 % BSA in 1 x PBS eingesetzt. Auch hier wurden 40 µl Antikörper auf den oberen Schnitt gegeben und auf den unteren Schnitt als Negativkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen 40 µl Lösung ohne

Antikörper. Als Zweitantikörper wurden 40 µl *Anti rat Rhodamine Red X* 1:200 verdünnt verwendet und auf die Schnitte gegeben.

Zum Eindecken wurden zwei Tropfen pro Objektträger RotiMount FluoCare DAPI und ein Deckgläschen verwendet.

2.12.5 HA-CK18-Färbung

Bei dieser Färbung handelt es sich um eine Kombinationsfärbung, bei welcher sowohl HA als auch Zytokeratin 18 zur Detektion von Tumorzellen mit Hilfe von zwei verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern dargestellt werden. Wie auch bei der Ki67 und der CD31-Färbung wurden die Schnitte zunächst mit Aceton fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Schnitte jedoch mit einem Avidin-Biotin-Block zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen zwischen Antikörper und Gewebe behandelt. Es wurde für 10 Minuten Avidin auf die Schnitte gegeben und anschließend für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte mit je einem Tropfen Biotin ebenfalls für 10 Minuten bedeckt und erneut 5 Minuten mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Blockierung für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Zum Nachweis von HA wurde HABP von Calbiochem 1:100 mit 1 % BSA in 1 x PBS verdünnt und je 40 µl auf den oberen Schnitt und 40 µl ohne HABP auf die Negativkontrolle gegeben und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als nächstes wurde Streptavidin Cy3 1:200 mit PBS verdünnt, zentrifugiert und 40µl auf alle Schnitte gegeben.

Nach einer Stunde Inkubation in einer abgedunkelten feuchten Kammer wurden die ungebundenen Antikörper durch Waschen in dunklen Küvetten entfernt und *guinea pig anti CK18*, der Erstantikörper zum Nachweis von Zytokeratin 18 konnte in einer 1:100 Verdünnung mit BSA auf die oberen Schnitte pipettiert werden (40 µl). Die Negativkontrollen wurden mit 40 µl BSA bedeckt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur in der dunklen feuchten Kammer und dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wurde der letzte Antikörper der Färbung, *goat anti guinea pig FITC IgG (H+L)* 1:200 mit PBS verdünnt und 40 µl auf alle Schnitte gegeben. Auch hier erfolgte eine einstündige Inkubation im Dunklen. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS wurden die Schnitte mit zwei Tropfen pro Objektträger RotiMount FluoCare DAPI und einem Deckgläschen eingedeckt.

Nach dem Mikroskopieren der Schnitte wurden die Deckgläschen und Objektträger mit handelsüblichem Nagellack zum Erhalt der Färbung versiegelt.

2.13 Auswertung der Hämalaun-Eosin-Färbung

Bei der Hämalaun-Eosin-Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung, welche eine erste morphologische Beurteilung der Tumorzelle, Zellinnenstrukturen wie Bindegewebe, Gefäße oder auch Ansammlungen von Entzündungszellen ermöglicht. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Axio Imager M2 Mikroskop der Firma Zeiss betrachtet und mit einer Axio-Cam HRC fotografiert. Um eine möglichst detaillierte Übersicht zu haben wurden Bilder mit einem 2,5er, 20er und 40er Objektiv aufgenommen. Die Belichtungszeiten waren innerhalb der einzelnen Vergrößerungen gleich, damit eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen Schnitte erzielt werden konnte.

2.14 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitte wurden ebenfalls mit einem Axio Imager M2 Mikroskop der Firma Zeiss betrachtet und mit einer Axio-Cam HRC fotografiert. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bei 4 °C im Dunklen nach Versiegelung der Deckgläschen und Objektträger mittels handelsüblichen Nagellacks. Die Aufnahme der Präparate erfolgte innerhalb der einzelnen Färbungen mit der gleichen Belichtungszeit um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erreichen.

Um die weitere Auswertung der Aufnahmen zu ermöglichen, wurden die in RGB-Farben vorliegenden, Fluoreszenzkanalbilder, mittels AxioVision Release 4.8.1 (11-2009) in ein TIF-Format umgewandelt und gespeichert. Die weitere Analyse der Bilder erfolgte mit dem Programm Fiji, einer Erweiterung von ImageJ. Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism6 (GraphPad Software, La Jolla, CA USA).

2.14.1 Auswertung der Ki67-Färbung

Es wurden pro Präparat 2 Bilder mit dem 10er Objektiv und 5 Bilder mit dem 20er Objektiv aufgenommen. Es wurde analysiert, wie sich das Verhältnis der gesamten Kernanzahl im Vergleich zu Ki67-positiven Kernen darstellt. Hierbei wurde, nach Übertragung der im TIF-Format gespeicherte Bilddateien in einen 8-Bit Farbkanal

zunächst ein binäres Bild in schwarz-weiß mit Hilfe des Li-Thresholds erstellt. Die Erkennung der Kerne erfolgte über eine Partikelanalyse nach Anwendung des *Watershed*-Algorithmus. Über die Zählfunktion von Fiji erfolgte die Quantifizierung der Zellkerne sowie der Ki67-positiven Signale. Mit der Formel (Ki67-pos. Kerne / Gesamt-Kernzahl) x 100 erhält man den Anteil der Proliferierenden Zellen in Prozent.

Als letzten Schritt wurde nun die für jedes Bild ermittelte Proliferationsrate zu einem Mittelwert des entsprechenden Tumors zusammengefasst und mittels GraphPad statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

2.14.2 Auswertung der TUNEL-Färbung

Pro Präparat wurden 2 Bilder mit dem 10er Objektiv und 5 Bilder mit dem 20er Objektiv aufgenommen. Hier wurde geprüft wie viele Zellen sich in der Apoptose befinden. Die Auswertung erfolgte analog zu Ki67.

2.14.3 Auswertung der CD31-Färbung

Hier wurden pro Schnitt 5 Bilder mit dem 10er Objektiv und 1 Bild mit dem 20er Objektiv für eine optimale Auswertbarkeit aufgenommen. Die Bilddatei im TIF-Format wurde in einen 8-Bit Farbkanal übertragen, ein binäres Bild erstellt und mittels *Autothreshold* nach Li bestimmt, bis zu welcher Intensität Fluoreszenzsignale gewertet werden sollen. Bei der Analyse der CD31-Färbung ist jedoch neben der CD31-positiven Fläche auch die Signalintensität von Bedeutung und wurde berücksichtigt. Hierfür wurde von Fiji, unter Berücksichtigung des Schwellenwertes, die Anzahl der gemessenen Signale, die Gesamtfläche in Pixel², die durchschnittliche Größe der gemessenen Signale und der Anteil der Signale am entsprechenden Bildausschnitt in Prozent (*Area fraction*) berechnet.

Die Durchschnittsintensität ergibt sich somit aus der Gesamtsumme der Intensitäten/Gesamtsumme der Fläche. Auch hier wurden die so bestimmten Mittelwerte der relativen Intensitäten der Fluoreszenzsignale mittels GraphPad statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

2.14.4 HA-CK18-Färbung

Bei der HA-CK18-Kombinationsfärbung wurden pro Schnitt 2 Bilder in der 20er Vergrößerung und 5 Bilder in der 40er Vergrößerung aufgenommen. Auch hier spielt die Intensität der HA und CK18-positiven Fläche eine wichtige Rolle und wurde analog der CD31-Färbung berücksichtigt. Die Mittelwerte der relativen Intensitäten der Fluoreszenzsignale wurden ebenfalls mittels GraphPad visualisiert.

2.15 Statistik

Um die ermittelten Daten statistisch auszuwerten, wurde die Software Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA USA) verwendet. Hierbei wurde bei einem Vergleich zweier Datensätze mit dem t-Test gearbeitet. Sollten mehr als zwei Datensätze untersucht werden, wurde eine *one-way*-ANOVA mit anschließendem post-hoc-Test nach Sidak (Vergleich aller Daten mit einer Kontrolle) oder Tukey (Vergleich aller Daten untereinander) angewandt.

Um die Überlebenswahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) zu ermitteln, wurde mit dem Log-rank-Verfahren (Mantel-Cox-Test) gearbeitet.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde auf einen P-Wert $< 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Prüfsubstanzen auf das Wachstum der Tumorzellen

Die Behandlung mit den einzelnen Prüfsubstanzen DCA und 4MU sowie der Kombinationstherapie erfolgte über einen Zeitraum von 60 Tagen ab Erreichen einer Tumorgöße von $> 30 \text{ mm}^3$.

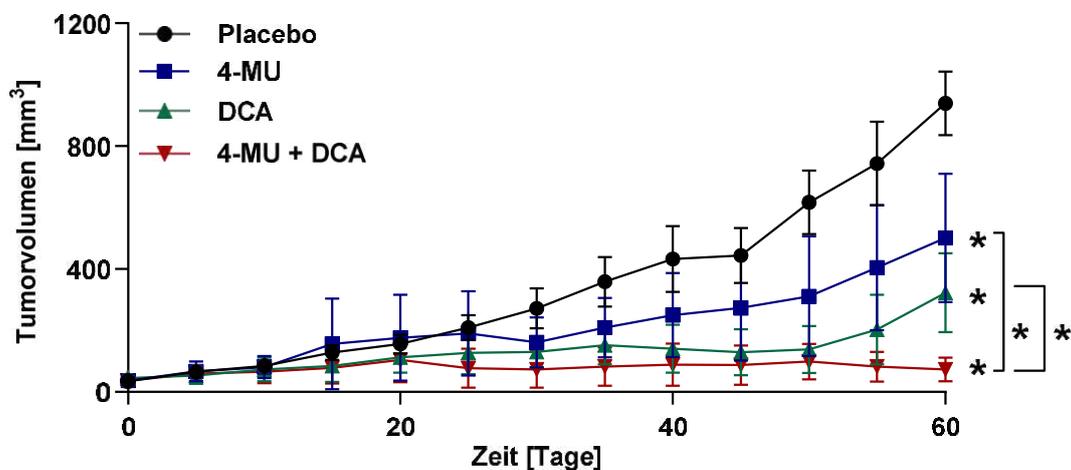


Abbildung 2 Tumorwachstum unter der Behandlung mit 4MU und DCA

Tumorgößenverlauf über 60 Tage unter Placebo-Kontrolle und unter Behandlung mit 4MU und/oder DCA. Die Behandlung mit den Einzelsubstanzen zeigte ein signifikant abgeschwächtes, aber nicht aufgehobenes Tumorwachstum. Die Kombination von 4-Methylumbelliferon (4MU) und Dichloracetat (DCA) führte ab Tag 20 zu einer Stagnation des Tumorwachstums mit einem signifikant flacherem Kurvenverlauf im Vergleich zur DCA-Monotherapie. Die Signifikanz wurde mit einer Two-Way-ANOVA über den gesamten Kurvenverlauf bestimmt. *Kontrolle* $n=15$, *4MU* $n=9$, *DCA* $n=10$, *DCA+4MU* $n=13$. Mittelwert \pm SEM, $*p < 0.05$.

Vergleicht man die Wachstumskurven der Tumoren von Mäusen, welche die 4MU-Monotherapie erhalten haben, mit den Tumorwachstumskurven der Placebogruppe, so ist in der Interventionsgruppe ein signifikant vermindertes Tumorwachstum zu verzeichnen. Ebenso verhält es sich beim Vergleich der Wachstumskurven der Tumore aus der DCA-Monotherapiegruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Kombinationstumortherapie führte im Verlauf zu einem Stopp des Tumorwachstums.

Die Tumore der Interventionsgruppe, welche sowohl 4MU als auch DCA erhalten hatte, wiesen darüber hinaus im direkten Vergleich mit den Monotherapiegruppen signifikant verminderte Tumervolumina auf (Abbildung 2).

3.2 Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Tumorzellmorphologie

Zur Beurteilung der Zellmorphologie der Tumore aus den einzelnen Gruppen, wurde die Hämalaun-Eosin-Färbung genutzt. Es wurden sowohl gering vergrößerte Aufnahmen zur Übersicht der Tumore, als auch stark vergrößerte Aufnahmen zur Betrachtung von Details aufgenommen.

In Abbildung 3 sieht man in geringen Vergrößerungen wie das Tumorstromawachstum der einzelnen Gruppen unter Verabreichung der Prüfsubstanzen variiert. Die Tumore der Placebogruppe sind recht groß und die Zellen liegen in dichten Verbänden zusammen. Das Tumorstroma ist diffus um die Zellen herum angeordnet und enthält viel Bindegewebe. Bei den Tumoren der 4MU-Monotherapie-Gruppe ist zu sehen, dass die Tumorzellen im *Clustern* zusammen gelagert liegen und von bindegewebigen Septen umgeben sind. Die Tumore sind kleiner als die der Placebo-Gruppe. Die Tumorstuktur der DCA-Monotherapie-Gruppe ist eher aufgelockert. Die Zellen liegen in lockeren Verbänden und wirken aufgequollen. Die Integrität der Tumore der Kombinations-Therapie wirkt zerrissen. Einzelne Zellen oder Zellverbände sind kaum mehr darstellbar.

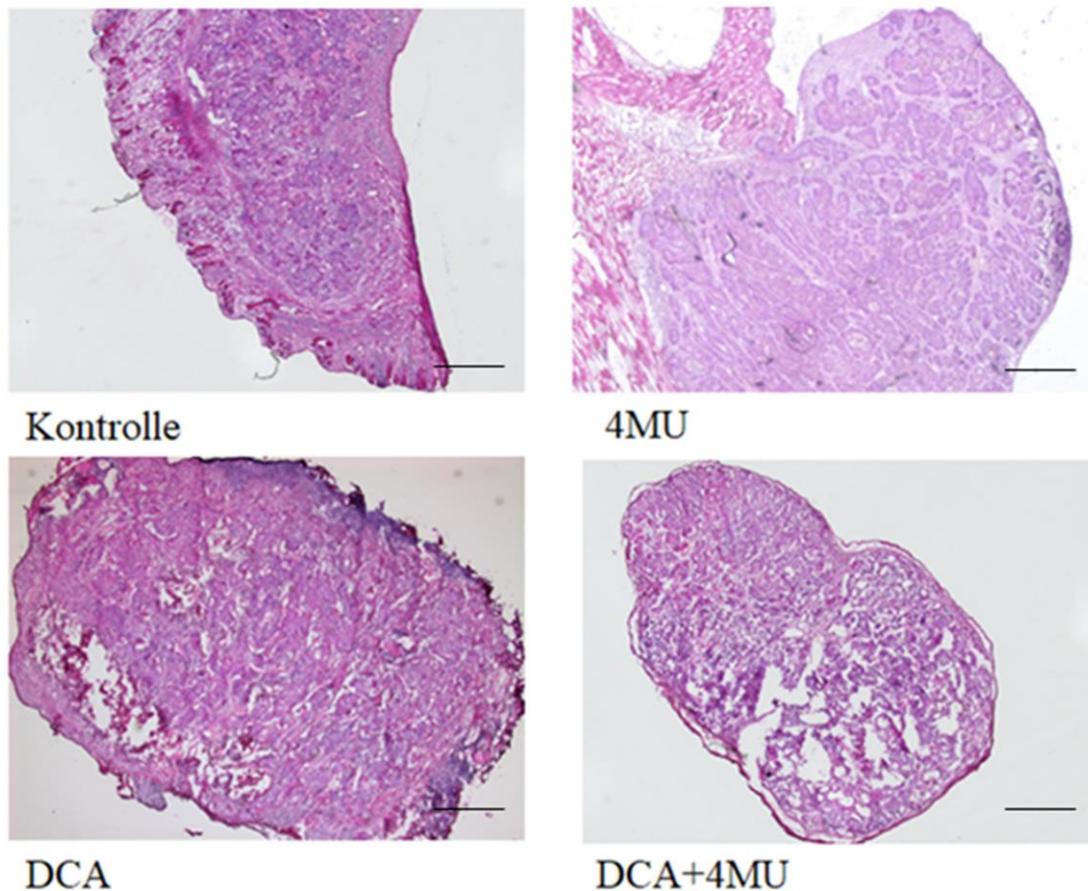


Abbildung 3 Übersichtsaufnahme in der Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zur Beurteilung morphologischer Veränderungen der Tumorzellen sowie des Tumorzellstromas unter Verabreichung von DCA und 4MU

Unter Kontrollbedingungen zeigten sich dichte Zellverbände und viel bindegewebiges Stroma, die Behandlung mit 4-Methylumbelliferon (4MU) führte zur Zusammenlagerung der Tumorzellen in *Clustern* und einer Verminderung des Stromas. Dichloracetat (DCA) verursachte ein Aufquellen der Zellen und durch Zelluntergang aufgelockerte Zellverbände. Die Kombination von DCA und 4MU zeigte eine zerrissene Tumorintegrität, einzelne Zellen sowie Stromastrukturen waren kaum darstellbar. *Bindegewebige Strukturen sowie Zytoplasma und andere basische Strukturen sind eosinophil (rötlich) gefärbt, Zellkerne und saure Gewebestrukturen basophil (bläulich, violett).*

Maßstabsbalken: 500 μ m

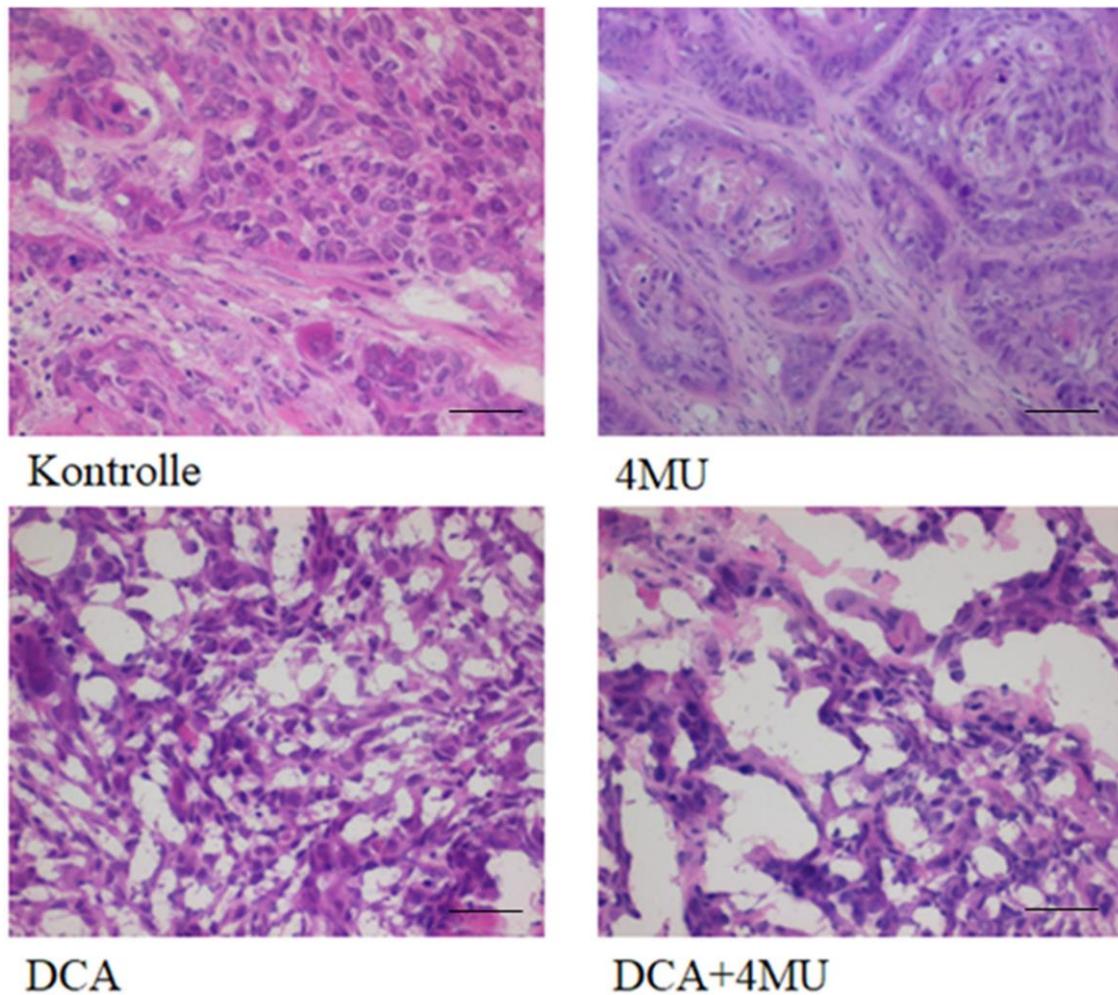


Abbildung 4 Detailaufnahmen in der Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zur Beurteilung morphologischer Veränderungen der Tumorzellen sowie des Tumorstromas unter Verabreichung von DCA und 4MU

In der Placebo-Gruppe konnten niedrig differenzierte, epitheliale Zellen, mit verschobener Kern-Plasma-Relation gesehen werden. Unter 4-Methylumbelliferon (4MU) kam es zur nestartigen Zusammenlagerung homogener wirkender Tumorzellen. Dichloracetat (DCA) verursachte ein Aufquellen der Zellen. Einzelne Zellen sowie Tumor-Stroma der DCA/4MU-Kombinations-Gruppe waren kaum darstellbar.

Maßstabsbalken: 100 µm

In den Detailaufnahmen ließen sich die einzelnen zu Tumoren herangewachsenen Kyse410-Zellen und das Tumorstroma in Bezug auf Morphologie und Wachstum beurteilen. In den histologischen Tumorbildern der Kontroll-Gruppe sah man niedrig differenzierte, epitheliale Tumorzellen mit einer zu Gunsten des Kerns verschobenen Kern-Zytoplasma-Relation. Auch lagen eine Heteromorphie sowie eine Vergrößerung der Kernkörperchen der Zellkerne vor. Es konnten Mitoseformationen gesehen werden.

Die Zellen der Tumore der 4MU-Gruppe lagen in Zellnestern beieinander. Sie wurden von bindegewebigen Faserzügen umgeben. Die Zellen waren etwas kleiner und wirkten einheitlicher als in der Kontrollgruppe.

Bei den Tumorzellen der DCA-Monotherapie-Gruppe konnte ein Aufquellen und Lösen der einzelnen Zellen aus dem Zellverband beobachtet werden.

In der Kombinations-Tumorthherapie-Gruppe ließen sich weniger intakte Zellen darstellen. Man konnte Zelldetritus und vereinzelt Entzündungszellen sehen. Die Tumorstruktur war zerrissen (Abbildung 4).

3.3 Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Apoptose der Tumorzellen

Um die Apoptoserate der Tumorzellen einzuschätzen, wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt.

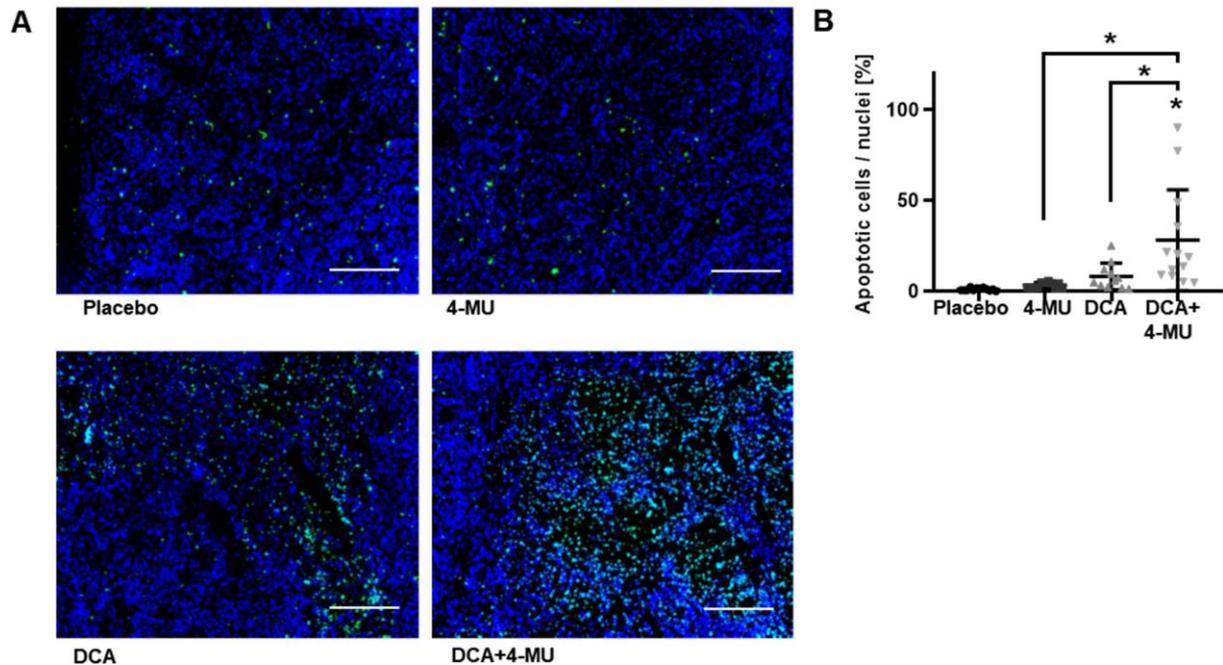


Abbildung 5 Apoptoserate (TUNEL-Färbung) in ösophagealen Tumorzellen unter Behandlung mit 4MU und DCA

Die Behandlung mit 4-Methylumbelliferon (4MU) sowie Dichloracetat (DCA) als Monotherapie führte nicht zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate. In der Kombinationstherapie aus DCA und 4MU konnte dagegen eine signifikante Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen detektiert werden **A** TUNEL-Färbung: Blau: Zellkerne, Grün: apoptotische Zellkerne, Maßstabsbalken: 100 μ m. **B** Auswertung der TUNEL-Färbung. Mittelwert \pm SEM, Placebo n=15, 4-MU n=9, DCA n=10, DCA+4-MU n=13. * p <0.05.

Im Vergleich mit der Kontrollgruppe führte die Monotherapie mit DCA nicht zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate. Auch bei der 4MU-Monotherapie ließ sich kein deutlicher Anstieg apoptotischer Zellen verzeichnen. In der Interventionsgruppe mit der Kombinationstherapie ist dagegen jedoch eine signifikante Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen, sowohl gegenüber Placebo als auch gegenüber den Monotherapie-Gruppen, erkennbar.

3.4 Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Proliferationsrate der Tumorzellen

Zur Untersuchung und Beurteilung der Proliferationsrate der Tumorzellen, wurde die Ki67-Färbung ausgewertet.

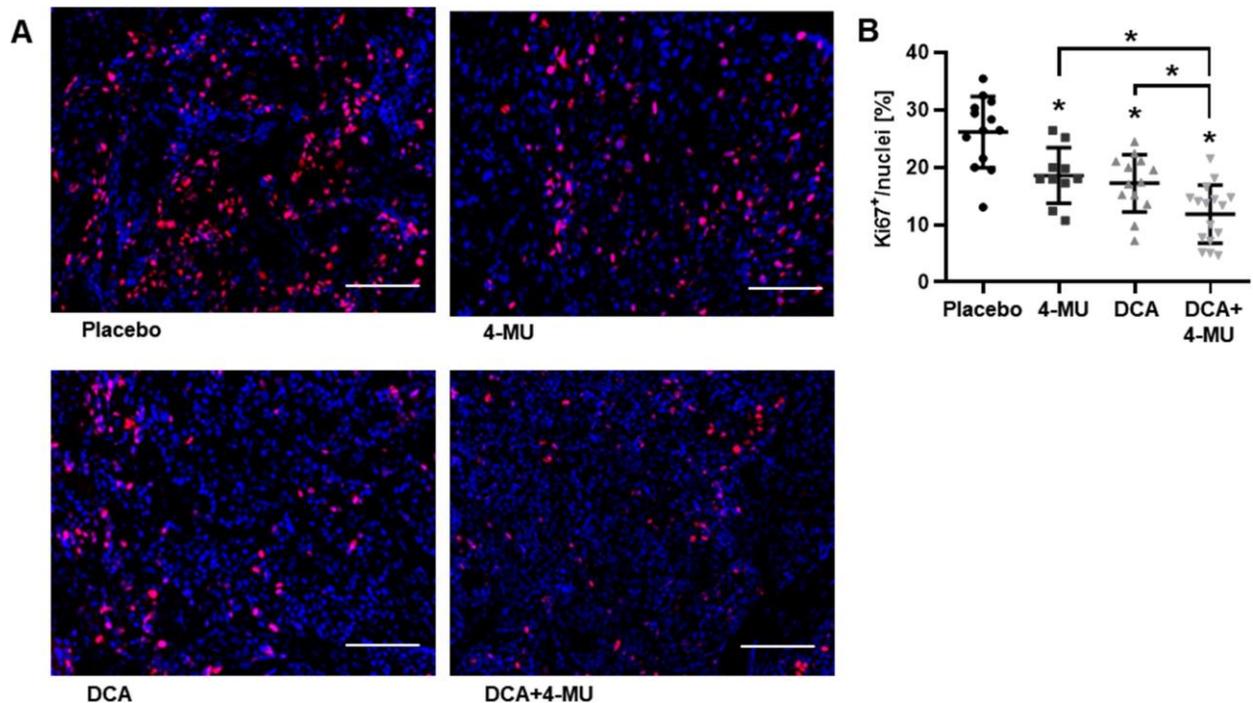


Abbildung 6 Proliferation (Ki67-Färbung) in ösophagealen Tumorzellen unter Behandlung mit 4MU und DCA

Sowohl die Behandlung mit 4-Methylumbelliferon (4MU) als auch die Dichloracetat (DCA)-Behandlung führten zu einer signifikanten Abnahme des Anteils proliferierender Zellen in den untersuchten Tumorschnitten. Die Kombination der beiden Substanzen resultierte in einer annähernd halbierten Proliferationsrate in den Tumorschnitten im Vergleich zu Placebo. Auch im Vergleich mit den Monotherapien zeigte sich eine signifikant verminderte Anzahl Ki67-positiver Kerne. *A* Ki67-Färbung: Blau: Zellkerne, Rot: Ki67-positive Zellkerne, Maßstabsbalken: 100 μ m. *B* Auswertung der Ki67-Färbung, Mittelwert \pm SEM, Placebo $n=15$, 4-MU $n=9$, DCA $n=10$, DCA+4-MU $n=13$. * $p<0.05$.

Unter Gabe der 4MU- oder DCA-Monotherapie reduzierte sich der Anteil proliferierender Zellen im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Intervention bereits signifikant. Am stärksten stagnierte die Zellteilung jedoch in der Gruppe, welche die Kombinationstumortherapie aus beiden Substanzen erhalten hatte. Hier kam es zu einer Reduktion der Zellproliferation um fast die Hälfte (Abbildung 6).

3.5 Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Vaskularisierung im Tumorgewebe

Zur Beurteilung der Vaskularisierung des Tumorgewebes wurde die CD31-Färbung analysiert.

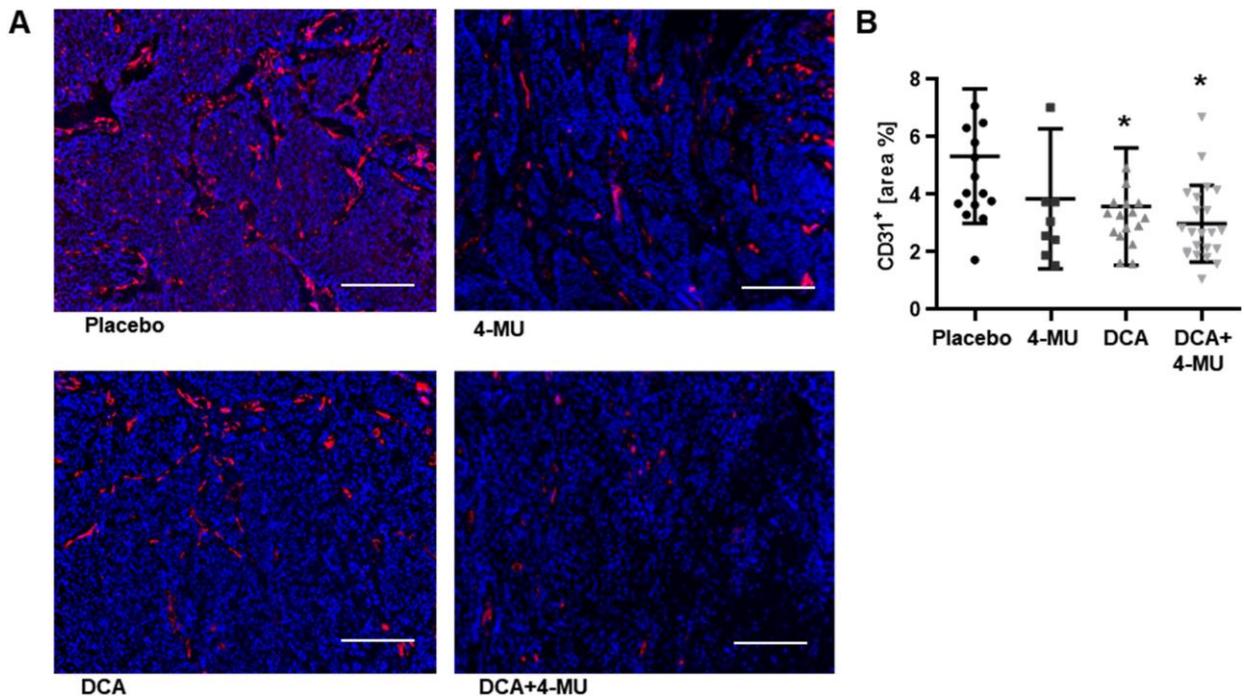


Abbildung 7 Angiogenese (CD31-Färbung) in ösophagealen Tumorzellen unter Behandlung mit 4MU und DCA

Die Behandlung mit 4-Methylumbelliferon (4MU) zeigte einen Trend zu verringerter Angiogenese in den Tumoren. Sowohl die Behandlung mit Dichloracetat (DCA) als auch die Kombination beider Substanzen führte zu einer signifikanten Reduktion der Angiogenese gemessen als CD31-positive Fläche.

A CD31-Färbung: Blau: Zellkerne, Rot: CD31-positive Zellkerne, Maßstabsbalken: 100 μ m, **B** Auswertung der CD31-Färbung, Markierung der CD31-positiven Strukturen mittels Autothreshold nach Li, Mittelwert \pm SEM, Placebo n=15, 4-MU n=9, DCA n=10, DCA+4-MU n=13. *p<0.05.

Unter der Monotherapie mit 4MU konnte nur eine Tendenz zur verringerten Tumolvaskularisierung detektiert werden. In der Gruppe der DCA-Monotherapie und der DCA- und 4MU- Kombinations-Therapie hingegen konnte anhand der CD31-positiv gemessenen Fläche eine signifikante Reduktion der Angiogenese im Vergleich zur Kontrollgruppe gesehen werden (Abbildung 7).

3.6 Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Hyaluronsäurekonzentration im Tumorgewebe

Um die Beeinflussung der HA-Synthese und den Gehalt der HA in der Tumormatrix zu untersuchen, wurde die HA/CK18-Kombinationsfärbung ausgewertet.

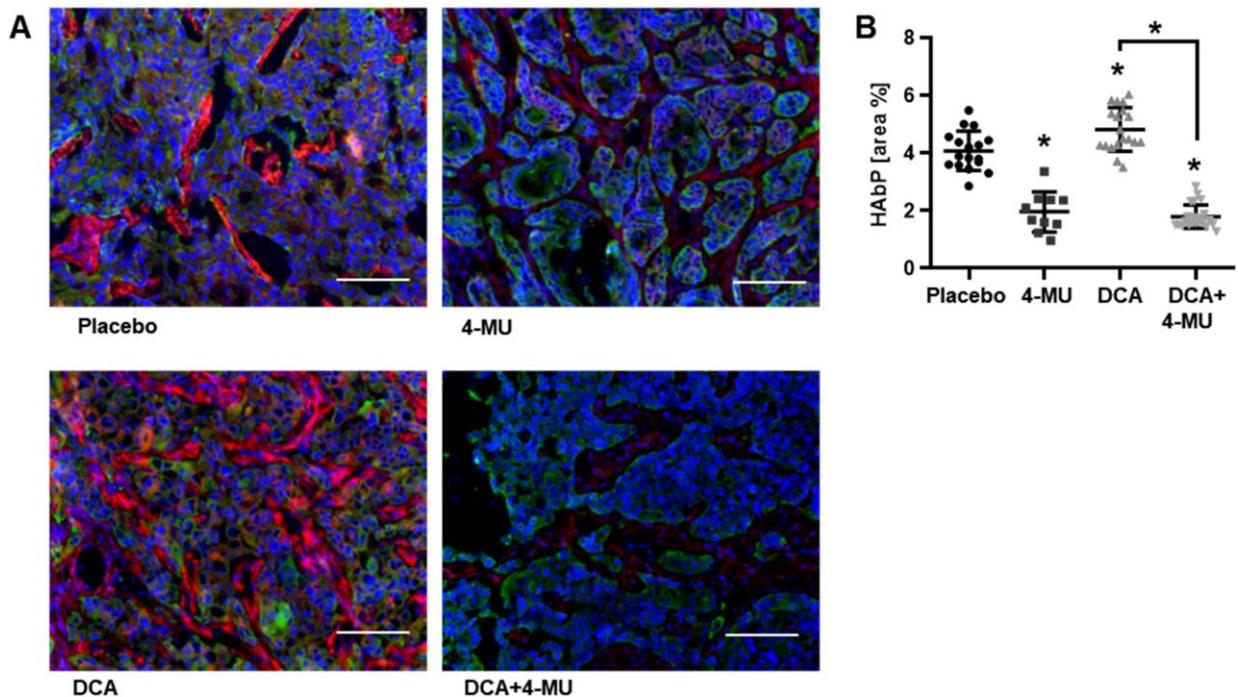


Abbildung 8 HA und Zytokeratin 18 (CK18) in ösophagealen Tumorschnitten unter Behandlung mit 4MU und DCA

Die Behandlung mit 4-Methylumbelliferon (4MU) resultierte in einer verminderten Hyaluronsäure (HA)-Menge im Tumorgewebe. Die Dichloracetat (DCA)-Behandlung steigerte die HA-Menge, die Kombination mit 4MU Behandlung nivellierte diesen Effekt.

*A HA/CK18-Doppelfärbung: Blau: Zellkerne, Grün: Tumorzellen (CK18), Rot: HA, Maßstabsbalken: 100 μ m. B Auswertung der HA/CK18-Doppelfärbung, Mittelwert \pm SEM, Placebo $n=15$, 4-MU $n=9$, DCA $n=10$, DCA+4-MU $n=13$. * $p<0.05$.*

Die alleinige Gabe von 4MU führte zu einer Verringerung der HA-Konzentration in der Tumormatrix. Nach DCA-Einzeltherapie dagegen konnte ein Anstieg des HA-Gehalts im Tumorgewebe gesehen werden. Bei Verabreichung beider Substanzen zeigte sich wie auch bei der Gabe der 4MU-Monotherapie eine reduzierte HA-Menge.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Stoffwechsellage in Tumorzellen und der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix besteht. Wie zuvor bei *in vitro* Vorversuchen, die nicht Teil dieser Arbeit sind, ist auch *in vivo* zu erkennen, dass die Reaktivierung der Mitochondrien und die damit verbundene Wiederherstellung der oxidativen Phosphorylierung durch DCA letztendlich auch einen Einfluss auf das extrazelluläre HA-System hat[5, 11]. Dadurch kann auch dem Wirkverlust einer alleinigen metabolischen Tumorthherapie, die sich den Warburg-Effekt zunutze macht, entgegengewirkt werden. Dies erfolgte durch die kombinierte Anwendung von DCA, welches eine Mitochondrien-Reaktivierung auslöst, zusammen mit 4MU, das die unter der DCA-Therapie gesteigerte HA-Matrixsynthese hemmt. Diese Kombination führte letztendlich zu einem signifikant verminderten Tumorwachstum. Auch zeigte sich, dass durch die Kombination beider Substanzen Einfluss auf die Neoangiogenese und die Vaskularisierung bestehen. Durch Beeinflussung bestimmter Signalwege aufgrund der Reduktion der HA-Menge in der EZM, kommt es letztendlich auch zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate und Verminderung der Proliferation.

Diese Effekte werden im Weiteren genauer beschrieben.

4.1 Einfluss einer Kombinationstherapie mit DCA und 4MU auf das Wachstum der Tumorzellen

Im Vergleich der Tumorwachstumskurven in Kapitel 3.1. ist eine Stagnation des Tumorwachstums bzw. ein annähernd konstant bleibendes Tumolvolumen unter der Kombinationstherapie, bestehend aus DCA und 4MU, im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Monotherapie zu sehen. Dies bestätigt die vermutete, synergistische Wirksamkeit der eingesetzten Substanzen auch *in vivo*. Dieser Effekt ist möglicherweise auf eine gesteigerte Apoptoserate der Tumorzellen durch Reaktivierung der Mitochondrien zurück zu führen. Aber auch die Verminderung der HA-Menge im EZR unter 4MU könnte eine wichtige Rolle spielen und zeigt sich im Verlauf der Wachstumskurven der Tumore unter Behandlung mit den Monotherapien. Hier ist aber im Vergleich zur Kombinationstherapie lediglich ein abgeschwächtes Tumorwachstum

zu verzeichnen und keine Stagnation. Wie in der Literatur beschrieben, hat DCA auch im Mausmodell durch Apoptose-Induktion einen Einfluss auf die Tumorprogression[9]. Auch die Hemmung des Tumorwachstum-begünstigenden Einflusses der HA durch die indirekte Blockierung der HAS1 bis 3 durch 4MU wurde im Mausmodell bestätigt[25] [28]. Die Hypothese, dass die Kombinationstherapie Einfluss auf das Tumorwachstum durch mitochondrial induzierte Apoptose und Reduktion der EZM hat, wurde durch spezifische immunhistochemische Färbungen weiter untersucht. Durch die gesteigerte Apoptoserate nach der DCA-4MU-Kombinationstherapie liegt die Vermutung nahe, dass hierdurch möglicherweise auch die Weiterleitung antiapoptotischer Signale durch HA in der EZM verhindert wird. Ebenfalls wurde nach weiteren Effekten wie einer verminderten Proliferationsrate gesucht.

4.2 Einfluss der Kombinationstherapie auf die HA-Konzentration im Tumorgewebe

Zur Darstellung und Beurteilung der HA-Menge im Tumorstroma im Verhältnis zu den Tumorzellen, wurde die HA/CK18-Kombinationsfärbung analysiert. Wie im Ergebnisteil beschrieben, liegt die HA-Konzentration in der EZM bei der Kombinationstumortherapie am niedrigsten. Bei der Monotherapie mit DCA steigt der HA-Anteil dagegen sogar noch über den HA-Gehalt der Placebogruppe im Stroma an. Diese Ergebnisse im Mausmodell entsprechen der eingangs genannten Hypothese, dass bei der alleinigen DCA-Behandlung zum Schutz vor Apoptose durch die Zelle nach Reaktivierung der Mitochondrien eine gesteigerte HA-Synthese resultiert[11]. Hier kommt es durch zwei Mechanismen zur Erhöhung der HA-Synthese. Durch Wiederherstellung der oxydativen Phosphorylierung entsteht mit gesteigerter Glucose-6-Phosphat-Produktion mehr Substrat für die HA-Bildung. Es kommt zur vermehrten Bildung von UDP-Glucuronsäure. Des Weiteren kommt es zu einem Anstieg des mitochondrialen Acetyl-CoA, welche ein Co-Faktor zur Bildung eines weiteren Substrats der HA-Synthese, dem N-Acetylglucosamin, ist[35]. HA wird nur allein aus diesen beiden Bausteinen gebildet, daher besteht auch ein direkter Zusammenhang zwischen Verfügbarkeit und HA-Bildung[36]. Es ist erwiesen, dass es zu einer gesteigerten HA-Synthese beim Mammakarzinom durch ein hohes Angebot an UDP kommt[37]. Somit ist die alleinige Verabreichung von DCA nicht nur wegen der Nebenwirkungen bei therapeutisch wirksamen Dosen problematisch. Die Wirksamkeit

bei der Monotherapie bezüglich der Apoptose-Einleitung zeigte sich nicht so deutlich wie in der Kombination mit 4MU. Durch die zusätzliche Hemmung der Hyaluronsäuresynthese und die dadurch bedingte Reduktion der HA im Tumorstroma kommt es zur mitochondrial induzierten Apoptose, was im Folgenden weiter erläutert wird.

4.3 Einfluss der Kombinationstherapie auf die Apoptose der Tumorzellen

Zur Analyse und Beurteilung der Tumorzell-Apoptose wurde eine TUNEL-Färbung eingesetzt. Wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, ist hier bei der Kombinationstherapie im Vergleich zu den Placebo- und Monotherapiegruppen eine signifikant größere Apoptoserate zu erkennen. Dies bestätigt die Hypothese, dass hier ein Synergismus vorliegt. Bei der alleinigen DCA-Verabreichung wurde vermehrt HA im Tumorstroma gebildet, welche Zellen als Schutz vor Apoptose dienen kann[11]. Durch die vermehrt gebildete Hyaluronsäure kommt es durch Bindung an beispielsweise CD44 oder RHAMM zur Weiterleitung antiapoptotischer Signale ins Zellinnere[15]. Hierbei werden verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen wie c-Met und EGFR aber auch Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert[22]. Wird nun aber die Synthese der HA durch 4MU blockiert, so kommt es zu einer gesteigerten, intrinsisch eingeleiteten Apoptose. Diese Beobachtung ist eine weitere Bestätigung, dass eine kombinierte Gabe von DCA und 4MU im Vergleich zur Monotherapie im Mausmodell mit Kyse 410 Zellen einen Tumorzell-inhibierenden Effekt ausübt. In anderen Studien wurde DCA bereits als Behandlungsoption bei einer Myokardischämie diskutiert. Hier kommt es durch den Einfluss von DCA vermehrt zur aeroben Oxydation von Kohlenhydraten aus Fettsäuren[38]. Möglicherweise resultiert dieser schützende Effekt auch durch die gesteigerte HA-Synthese, da durch die oben genannten Mechanismen die Apoptose weiterer Zellen durch eine erhöhte HA-Synthese verringert wird. 2019 wurde eine Arbeit veröffentlicht, welche die positive Wirkung von HA auf die Erholung und Heilung nach kardialer Ischämie untersucht hat[39].

4.4 Einfluss der Kombinationstherapie auf die Proliferation der Tumorzellen

Um die Proliferations-Tendenz der Tumorzellen unter der Kombinationstherapie beurteilen zu können, wurde Ki67 immunhistochemisch dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die Proliferationsrate der Zellen unter DCA-Monotherapie, wie in der Literatur bereits beschrieben[9], im Vergleich zur Placebogruppe signifikant vermindert war. In den Tumoren der Kombinationstherapie war die Proliferationsrate sogar annähernd halbiert. Daraus ist abzuleiten, dass es durch Reduktion der HA-Konzentration, durch zusätzliche Gabe von 4MU, zu einer weiteren Reduktion der Tumorzellproliferation kommt. Dieser Effekt von 4MU wurde bereits in anderen experimentellen Ansätzen untersucht[16], konnte im Mausmodell mit Kyse 410 *Xenografts* jedoch nur in Tendenzen und nicht signifikant gezeigt werden. Auch dadurch ist deutlich der Synergismus der beiden Wirkstoffe zu sehen. Es ist also anzunehmen, dass durch einen verminderten HA-Gehalt und die Induktion der Apoptose durch Reaktivierung der Mitochondrien, die Tumorzellproliferation im Sinne einer Abnahme beeinflusst wird. Dass die HA tatsächlich in verminderter Konzentration in der Tumormatrix vorhanden ist, wurde mit der HA/CK18-Kombinationsfärbung untersucht (s.o.).

4.5 Einfluss der Kombinationstherapie auf die Vaskularisierung im Tumorgewebe

Zur Untersuchung der Vaskularisierung im Tumorgewebe wurde die CD31-Färbung zur Darstellung von Endothelzellen analysiert. Hier ist, wie in Kapitel 3.5 bereits beschrieben, lediglich in den Tumoren der Kombinationstherapie eine signifikante Reduktion der Vaskularisierung zu erkennen. In den Monotherapiegruppen ist dagegen nur ein Trend zur Abnahme der Tumorgefäße zu sehen. Die in der Einleitung bereits beschriebenen Zusammenhänge zwischen HA, HA-Rezeptoren wie CD44 und der Neoangiogenese in Tumorzellen[40] sind auch in diesem Versuchsaufbau nachvollziehbar. Durch Bindung der HA an CD44 kommt es über Aktivierung verschiedener Signalwege zur Einleitung der Neoangiogenese[40]. Folglich werden bei Abnahme der HA im EZM auch weniger neoangiogenetische Signale durch die verminderte Bindung von HA induziert. Auch hier ist die vermutete synergistische Wirksamkeit von DCA und 4MU zu sehen. Durch DCA in Kombination mit 4MU kommt es zur Apoptoseinduktion und somit Reduktion der Tumorzellen sowie zur

Reduktion der HA. Es kommt daher zu einer verminderten Bindung zwischen HA und HA-Rezeptoren und daher zur Reduktion der Vaskularisierung im verbleibenden Tumorgewebe.

Neuere Studien haben auch gezeigt, dass DCA in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika zu einer Verringerung der Toxizität führt sowie eine Resistenz verhindern kann. Auch konnte die therapeutische Dosis des Chemotherapeutikums reduziert werden[41]. Untersucht wurde dies unter anderem *in vitro* und im Xenograft-Modell mit Paclitaxel beim Bronchialkarzinom[42] und beim Blasenkarzinom mit Cisplatin ebenfalls *in vitro*[43]. Hier zeigten sich eine gesteigerte Sensibilisierung gegenüber den Chemotherapeutika sowie eine gesteigerte Apoptose der Tumorzellen[41]. Auch wurde Sorafenib, ein Proteinkinaseinhibitor, beim hepatozellulärem Karzinom in Kombination mit DCA an Zellkulturen untersucht. Als Ergebnis war auch hier ein verbessertes therapeutisches Ansprechen auf die Behandlung durch Wiederherstellung der mitochondrialen Aktivität zu erkennen[44].

Auch wurde in neueren Studien die Wirkung von DCA in Kombination mit weiteren Medikamenten untersucht, welche ursprünglich nicht zur Behandlung von Krebs entwickelt wurden, aber bei bestimmten Tumorentitäten unterstützend eingesetzt werden[41]. So konnte beispielsweise Propranolol als Beta-Blocker in Kombination mit DCA *in vitro* und im Mausmodell ergänzend bei Tumoren im Kopf- und Halsbereich verabreicht werden[45]. Es zeigt sich also, dass Tumorbehandlungen, die additiv zu herkömmlichen Behandlungsstrategien eingesetzt werden, durchaus ein wichtiger Baustein zur effektiven Behandlung onkologischer Erkrankungen sind und zukünftig eine größere Rolle spielen könnten.

4.6 Ausblick

In Hinblick auf zukünftige Forschungen wären Untersuchungen der beiden Substanzen 4MU und DCA besonders in Kombination an weiteren Tumorentitäten interessant, um zu ermitteln, ob die Ergebnisse dieser Arbeit auf andere Karzinomzellen übertragbar sind. Wichtig wären zunächst weitere *in vitro* und im Folgenden *in vivo* Versuche an Mausmodellen. Auch klinische Studien zur Kombinationstherapie beim Ösophaguskarzinom, in Ergänzung zu bestehenden Behandlungsregimen, wären interessant. Wichtig wäre hier zu untersuchen, in wie weit die Kombination

möglicherweise positiven Einfluss auch auf das Ansprechen und die Resistenzbildung der Tumorzellen gegenüber herkömmlichen Zytostatika hat. Hierzu existieren bereits einige Arbeiten an Zell- und auch Mausmodellen. So wurde bereits beim Blasenkarzinom DCA in der Kombination mit Cisplatin sowohl *in vitro* als auch im Xenograft-Modell untersucht. Es zeigte sich ein erhöhtes Ansprechen der Chemotherapie aufgrund einer PDK4 Inhibition sowie ein gesteigerter Zelluntergang der Tumorzellen[41, 43]. Auch wurde bereits 4MU beim Prostatakarzinom *in vivo* an Mäusen untersucht. Hier zeigte sich unter anderem eine verringerte Vaskularisierung innerhalb der Tumore, die Proliferationsrate der Tumorzellen war herabgesetzt und es verhinderte vollständig eine ossäre Metastasierung[46]. Ergänzende Studien mit 4MU in Kombination mit DCA könnten interessant sein bezüglich des oben beschriebenen synergistischen Effektes.

Sowohl DCA als auch 4MU sind beide oral verfügbar und gut verträglich und somit auch prinzipiell bei multimorbiden Patienten einsetzbar, die eine zytostatische Therapie nicht oder nur mit verringerter Dosis verkraften würden. Darüber hinaus sind beide Substanzen bereits als Medikamente in anderen Bereichen zugelassen. Somit sind die Nebenwirkungen für den Menschen auch bekannt und erlauben eine realistische Risiko-Nutzen-Einschätzung. Dies erleichtert möglicherweise auch die Zulassung weiterer klinischer Studien.

Aufgrund dieser Überlegungen und bereits erfolgter Forschung ist es zukünftig wichtig, ein größeres Augenmerk auf additive und unterstützende Behandlungen ergänzend zu den bekannten Tumorthérapien zu legen, um Wirksamkeit und Erfolg der Krebsbehandlung zu verbessern. Die hier erarbeiteten Ergebnisse können somit einen weiteren Teil zur Optimierung der medikamentösen Tumorthérapie beitragen.

5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde die synergistische Wirksamkeit von DCA und 4MU untersucht und nachgewiesen. Die initial aufgestellte Hypothese, dass es bei der alleinigen Therapie mit DCA nur zu einem eingeschränkten Therapieerfolg kommt und durch zusätzliche Gabe von 4MU ein stärkerer, tumorreduktiver Effekt erzielt werden kann, wurde im Mausmodell verifiziert. Durch die Kombinationstherapie konnten eine Stagnation des Tumorwachstums, eine Reduktion der Proliferationsrate, eine gesteigerte Apoptose sowie eine verminderte Neoangiogenese erreicht werden.

Da die Nebenwirkungen der beiden Präparate, wie eingangs beschrieben, im Vergleich zu konventionellen Zytostatika oder nuklearmedizinischen Therapiekonzepten eher gering sind, stellt diese Form der Tumorthherapie eine interessante und neue Therapieoption dar. Da sowohl DCA als auch 4MU *per os* verabreicht werden können, ist auch die Anwendung unkompliziert und ambulant gut durchführbar.

Zukünftig wären weitere Forschungsarbeiten interessant, um beispielsweise die Wirksamkeit der Therapie auf andere Tumorentitäten *in vitro* und im Mausmodell zu untersuchen. Aber auch die Durchführung klinischer Studien zur Überprüfung dieser neuen Kombinationstherapie, kann ein weiterer Schritt auf dem Weg zur Entwicklung einer nebenwirkungsarmen und selektiv wirksamen Tumorthherapie auch ergänzend zu bisher bekannten und angewendeten Tumorthapien beim Menschen sein.

Literaturverzeichnis

1. Pennathur, A., et al., *Oesophageal carcinoma*. Lancet, 2013. 381(9864): p. 400-12.
2. Enzinger, P.C. and R.J. Mayer, *Esophageal cancer*. N Engl J Med, 2003. 349(23): p. 2241-52.
3. DKG, *Leitlinienprogramm Onkologie S3-Leitlinie Ösophaguskarzinom Kurzversion*. 2015.
4. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY*. J Gen Physiol, 1927. 8(6): p. 519-30.
5. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. 324(5930): p. 1029-33.
6. Sutendra, G. and E.D. Michelakis, *Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology*. Front Oncol, 2013. 3: p. 38.
7. Löffler, *Biochemie und Pathobiochemie*. 2014.
8. Stacpoole, P.W., *The dichloroacetate dilemma: environmental hazard versus therapeutic goldmine--both or neither?* Environ Health Perspect, 2011. 119(2): p. 155-8.
9. Bonnet, S., et al., *A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth*. Cancer Cell, 2007. 11(1): p. 37-51.
10. Chu, Q.S., et al., *A phase I open-labeled, single-arm, dose-escalation, study of dichloroacetate (DCA) in patients with advanced solid tumors*. Invest New Drugs, 2015. 33(3): p. 603-10.
11. Twarock, S., et al., *Inhibition of the hyaluronan matrix enhances metabolic anticancer therapy by dichloroacetate in vitro and in vivo*. Br J Pharmacol, 2019. 176(23): p. 4474-4490.
12. Erickson, M. and R. Stern, *Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism*. Biochem Res Int, 2012. 2012: p. 893947.
13. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. J Biol Chem, 1999. 274(35): p. 25085-92.
14. Stern, R., A.A. Asari, and K.N. Sugahara, *Hyaluronan fragments: an information-rich system*. Eur J Cell Biol, 2006. 85(8): p. 699-715.
15. Sironen, R.K., et al., *Hyaluronan in human malignancies*. Exp Cell Res, 2011. 317(4): p. 383-91.
16. Turley, E.A., P.W. Noble, and L.Y. Bourguignon, *Signaling properties of hyaluronan receptors*. J Biol Chem, 2002. 277(7): p. 4589-92.
17. Toole, B.P., *Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities*. Clin Cancer Res, 2009. 15(24): p. 7462-7468.
18. Lesley, J., R. Hyman, and P.W. Kincade, *CD44 and its interaction with extracellular matrix*. Adv Immunol, 1993. 54: p. 271-335.
19. Bourguignon, L.Y., et al., *A CD44-like endothelial cell transmembrane glycoprotein (GP116) interacts with extracellular matrix and ankyrin*. Mol Cell Biol, 1992. 12(10): p. 4464-71.
20. Bourguignon, L.Y., D. Zhu, and H. Zhu, *CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression*. Front Biosci, 1998. 3: p. d637-49.

21. Lokeshwar, V.B., N. Iida, and L.Y. Bourguignon, *The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation*. J Biol Chem, 1996. 271(39): p. 23853-64.
22. Misra, S., et al., *Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer*. Front Immunol, 2015. 6: p. 201.
23. Lynn, B.D., E.A. Turley, and J.I. Nagy, *Subcellular distribution, calmodulin interaction, and mitochondrial association of the hyaluronan-binding protein RHAMM in rat brain*. J Neurosci Res, 2001. 65(1): p. 6-16.
24. Entwistle, J., C.L. Hall, and E.A. Turley, *HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton*. J Cell Biochem, 1996. 61(4): p. 569-77.
25. Kakizaki, I., et al., *A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone*. J Biol Chem, 2004. 279(32): p. 33281-9.
26. Dologiet, *Fachinformation Cholspasmin(R) forte*. 2014.
27. Nakazawa, H., et al., *4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells*. Cancer Chemother Pharmacol, 2006. 57(2): p. 165-70.
28. Twarock, S., et al., *Inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma progression by in vivo targeting of hyaluronan synthesis*. Mol Cancer, 2011. 10: p. 30.
29. Lokeshwar, V.B., et al., *Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells*. Cancer Res, 2010. 70(7): p. 2613-23.
30. Yoshihara, S., et al., *A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells*. FEBS Lett, 2005. 579(12): p. 2722-6.
31. Stern, R., et al., *Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited*. Exp Cell Res, 2002. 276(1): p. 24-31.
32. Ssniff, *Katalog Futtermittel Mäuse und Ratten*. 2005.
33. Sarbia, M., et al., *Characterization of two newly established cell lines derived from squamous cell carcinomas of the oesophagus*. Anticancer Res, 1997. 17(3C): p. 2185-92.
34. life technologies, *click-iT Plus TUNEL Assay*. 2014.
35. Clark, A.S., et al., *Dichloroacetate inhibits glycolysis and augments insulin-stimulated glycogen synthesis in rat muscle*. J Clin Invest, 1987. 79(2): p. 588-94.
36. Tammi, R.H., et al., *Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis*. FEBS J, 2011. 278(9): p. 1419-28.
37. Oikari, S., et al., *UDP-sugar accumulation drives hyaluronan synthesis in breast cancer*. Matrix Biol, 2018. 67: p. 63-74.
38. Bersin, R.M. and P.W. Stacpoole, *Dichloroacetate as metabolic therapy for myocardial ischemia and failure*. Am Heart J, 1997. 134(5 Pt 1): p. 841-55.
39. Petz, A., et al., *Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury*. Circ Res, 2019. 124(10): p. 1433-1447.
40. Lennon, F.E., et al., *Transactivation of the receptor-tyrosine kinase ephrin receptor A2 is required for the low molecular weight hyaluronan-mediated angiogenesis that is implicated in tumor progression*. J Biol Chem, 2014. 289(35): p. 24043-58.
41. Tataranni, T. and C. Piccoli, *Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications*. Oxid Med Cell Longev, 2019. 2019: p. 8201079.

42. Lu, X., et al., *Dichloroacetate enhances the antitumor efficacy of chemotherapeutic agents via inhibiting autophagy in non-small-cell lung cancer*. *Cancer Manag Res*, 2018. 10: p. 1231-1241.
43. Woolbright, B.L., et al., *The Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-4 (PDK4) in Bladder Cancer and Chemoresistance*. *Mol Cancer Ther*, 2018. 17(9): p. 2004-2012.
44. Fekir, K., et al., *Retrodifferentiation of Human Tumor Hepatocytes to Stem Cells Leads to Metabolic Reprogramming and Chemoresistance*. *Cancer Res*, 2019. 79(8): p. 1869-1883.
45. Lucido, C.T., W.K. Miskimins, and P.D. Vermeer, *Propranolol Promotes Glucose Dependence and Synergizes with Dichloroacetate for Anti-Cancer Activity in HNSCC*. *Cancers (Basel)*, 2018. 10(12).
46. Yates, T.J., et al., *Dietary supplement 4-methylumbelliferone: an effective chemopreventive and therapeutic agent for prostate cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2015. 107(7).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Erstellung meiner Doktorarbeit auf unterschiedliche Weise unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock für die hervorragende Betreuung und die langjährige Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung sowie den Zugang zu den Materialien möchte ich dem Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, insbesondere dem Direktor Herrn Univ.-Professor Dr. Jens W. Fischer meinen Dank ausdrücken.

Zusätzlich danke ich meiner Zweitgutachterin Frau Professor Dr. rer. nat. Martina Krüger für die spontane und unkomplizierte Übernahme des Gutachtens.

Meinen Eltern, meinem Mann und meiner lieben Freundin Uli danke ich für ihre Geduld und die vielen Ermutigungen.