

Aus dem Institut für Pharmakologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

**In-Vivo-Untersuchungen zum Stellenwert der
Hyaluronsäurematrix als Vermittler
einer erhöhten Tumorprogression unter
einer diabetischen Stoffwechsellage im
ösophagealen Plattenepithelkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ulrike Peters

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: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Was lange währt, wird endlich gut!

Deutsches Sprichwort

In Liebe meiner Familie gewidmet, die niemals aufgehört hat, an mich zu glauben. Und meiner lieben Freundin Kathy, 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, Ulrike Peters, Daniel J. Gorski, Katharina Rock and Jens W. Fischer, 2017, *Hyperglycaemia and aberrated insulin signalling stimulate tumour progression via induction of the extracellular matrix component hyaluronan*. International Journal of Cancer, 141, 791–804

Zusammenfassung

Verschiedene epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Patienten mit Typ I und Typ II Diabetes häufiger als nicht-diabetische Patienten an bestimmten Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem Ösophaguskarzinom, erkranken. Bis heute ist der genaue Pathomechanismus nicht endgültig geklärt. Man vermutet, dass die Hyaluronsäure, die aus Glukose-Derivaten gebildet wird und als tumorprogressionsfördernd gilt, eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielt. Mit dem oral verfügbaren Hyaluronsäure-Synthase-Inhibitor 4-Methylumbelliferon (4-MU) bestünde eine Möglichkeit, den Hyaluronsäuregehalt und die damit verbundenen tumorprogressionsfördernden Eigenschaften in den Tumorzellen zu verringern.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher, den Einfluss von Hyperglykämien im Rahmen einer diabetischen Stoffwechsellaage sowie von 4-MU auf die Hyaluronsäuresynthese zu untersuchen. Des Weiteren sollen die Auswirkungen des Hyaluronsäuregehaltes auf das Tumorwachstum, die Vaskularisierung, die Proliferation und die Apoptose genauer eruiert werden. Dafür wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es durch eine Hyperglykämie, welche beim Typ I und Typ II Diabetes auftreten können, zu einer verstärkten Bildung von Glukose-Derivaten kommt, die für die Hyaluronsäuresynthese verwendet werden. Somit kommt es unter einer diabetischen Stoffwechsellaage zu einem erhöhten Hyaluronsäuregehalt im Bereich der Tumorzellen. In diesem Rahmen steigen auch die tumorprogressionsfördernden Eigenschaften der Hyaluronsäure an. Zudem wird gezeigt, dass die Hyaluronsäuresynthese durch das 4-MU sowohl unter physiologischer als auch unter diabetischer Stoffwechsellaage gehemmt wird, wodurch es zu einer Abnahme der Tumorprogression kommt.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die durch eine Hyperglykämie bedingte Steigerung der Hyaluronsäuresynthese einen entscheidenden Zusammenhang zwischen Patienten mit Diabetes und der erhöhten Inzidenz verschiedener Tumorentitäten darstellt. Durch die Senkung des Hyaluronsäuregehaltes könnte das oral verfügbare 4-MU als eine mögliche Therapieoption von Krebserkrankungen bei diabetischen Patienten in Frage kommen.

Summary

Several epidemiologic studies have shown that patients with type I and type II diabetes more often come down with certain tumor entities, for example esophageal cancer, than other patients. Until now the exactly mechanism has not been clarified. It is assumed that the hyaluronic acid, which is formed from glucose derived precursors and which supports tumor progression, plays an important role. The orally available small molecule inhibitor of hyaluronan synthases, 4-methylumbelliferone, might be a good option for reducing the hyaluronic acid content and in turn hyaluronan-driven tumor progression.

The aim of this work is to analyze the influence of hyperglycemia and the impact of hyaluronan synthesis inhibition under this condition on the hyaluronic acid-synthesis. Furthermore, the effects of the hyaluronic acid content on tumor growth, angiogenesis, proliferation and apoptosis were examined.

The results of this work show that hyperglycemia, which is a characteristic of diabetes type I and II, leads to an increase in hyaluronic acid deposition. As a consequence, tumor progression, proliferation and vascularization are induced. This process can be inhibited by 4-methylumbelliferone under physiological as well as under diabetic conditions.

The hyperglycemia-driven increase of the hyaluronic acid synthesis seems to represent an important link between diabetes and the higher incidence of various tumor entities. By reducing the hyaluronic acid content, the orally available 4-methylumbelliferone could be a good therapeutic option against cancer for diabetic patients.

Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CK	Creatinkinase/Zytokeratin
c-Met	<i>tyrosine-protein kinase Met</i>
DM	Diabetes mellitus
EGFR	<i>Epidermal-Growth-Factor-Receptor</i>
ERK	<i>Extrazellular-signal regulated kinase</i>
FCS	Fetales Kälberserum
GERD	<i>Gastroesophageal reflux disease</i>
GLUT	Glucose-Transporter
HA	Hyaluronsäure
HABP	Hyaluronsäurebindeprotein
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HCl	Salzsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HYAL	Hyaluronidase
IGFR-1	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
LADA	<i>Latent autoimmune diabetes with onset in adults</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MODY	<i>Maturity onset diabetes of the young</i>
ND	Nicht Diabetes mellitus
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pI3K/AKT	Phosphoinositid 3-Kinase/Proteinkinase B
pPFKFB1	6-Phosphofrukto-2/Fruktose-2,6-Bisphosphatase 1 Protein
RHAMM	<i>Receptor for hyaluronan mediated motility</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TIF	<i>Tagged Image File</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
UDP	Uridindiphosphat
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Ösophaguskarzinom	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.1.3 Therapie und Prognose.....	2
1.2 Diabetes mellitus	2
1.2.1 Definition und Epidemiologie	2
1.2.2 Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Tumorerkrankungen.....	3
1.3 Hyaluronsäure.....	5
1.3.1 Struktur und Synthese	5
1.3.2 Vorkommen und Funktion	5
1.3.3 Einfluss auf die Tumorprogression	6
1.4 4-Methylumbelliferon	6
1.4.1 Struktur und Wirkmechanismus.....	6
1.4.2 Einsatz in der Medizin und Nebenwirkungen.....	7
1.5 Zusammenhang zwischen Diabetes, Hyaluronsäure und Tumorprogression.....	7
1.6 Ziel der Arbeit	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Substanzen	9
2.2 Puffer und Lösungen	10
2.3 Antikörper und TUNEL-Kit.....	11
2.3.1 Hyaluronsäure-Zytokeratin18-Färbung.....	11
2.3.2 CD31-Färbung.....	12
2.3.3 Ki67-Färbung	12
2.3.4 TUNEL-Färbung.....	12
2.4 Geräte und Materialien	13
2.5 Crl:NMRI-Foxn1^{nu} Mäuse	14
2.6 Trinkwasser und Futter	14

2.7	OSC-1 Zellen	15
2.8	Nacktmaus-Xenograft-Modell	15
2.9	Gewebeentnahme	16
2.10	Anfertigung der Kryoschnitte.....	16
2.11	Hämalaun-Eosin-Färbung	16
2.12	Immunhistochemische Färbungen	17
	2.12.1 Hyaluronsäure-Zytokeratin18-Färbung.....	17
	2.12.2 CD31-Färbung.....	18
	2.12.3 Ki67-Färbung	18
	2.12.4 TUNEL-Färbung.....	19
2.13	Auswertungsvorgehen	20
	2.13.1 Auswertung der Hämalaun-Eosin-Färbung.....	20
	2.13.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mittels Mikroskops	20
	2.13.2.1 Auswertung der Hyaluronsäure und Zytokeratin18-Färbung	20
	2.13.2.2 Auswertung der CD31-Färbung.....	21
	2.13.2.3 Auswertung der Ki67-Färbung	21
	2.13.2.4 Auswertung der TUNEL-Färbung.....	21
	2.13.3 Statistik	21
3	Ergebnisse	23
3.1	Einfluss von Diabetes und 4-Methylumbelliferon auf das Tumorwachstum sowie das Überleben	23
3.2	Morphologische Veränderungen	25
3.3	Auswirkungen einer diabetischen Stoffwechsellaage und von 4- Methylumbelliferon auf den Hyaluronsäuregehalt des Tumor- und Stromagewebes.....	27
3.4	Vaskularisierung unter einer diabetischen Stoffwechsellaage und 4- Methylumbelliferon	29
3.5	Einfluss von Diabetes und 4-Methylumbelliferon auf die Proliferationsrate	31
3.6	Einfluss von Diabetes und 4-Methylumbelliferon auf die Apoptose.	33
4	Diskussion.....	35
4.1	Auswirkungen von Hyperglykämien auf das Tumorwachstum.....	35
4.2	Auswirkungen von einer diabetischen Stoffwechsellaage sowie 4- Methylumbelliferon auf den Hyaluronsäuregehalt	36
4.3	Einfluss der erhöhten Hyaluronsäuresynthese unter diabetischer Stoffwechsellaage auf die Vaskularisierung.....	37
4.4	Einfluss einer erhöhten Hyaluronsäuresynthese unter diabetischer Stoffwechsellaage auf die Proliferation von Tumorzellen.....	38
4.5	Einfluss einer erhöhten Hyaluronsäuresynthese unter diabetischer Stoffwechsellaage auf die Apoptose.....	38
4.6	Ausblick	39

5	Schlussfolgerung	41
6	Literaturverzeichnis.....	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substanzen.....	9
Tabelle 2: Puffer und Lösungen	11
Tabelle 3: Substanzen HA-Färbung	11
Tabelle 4: Antikörper CK18-Färbung.....	11
Tabelle 5: Antikörper CD31-Färbung.....	12
Tabelle 6: Antikörper Ki67-Färbung	12
Tabelle 7: Geräte und Materialien.....	14

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorwachstum unter diabetischer und nicht diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Behandlung mit 4-MU	23
Abbildung 2: Überlebensrate der diabetischen Tiere mit und ohne 4-MU-Behandlung	24
Abbildung 3: Übersichtsaufnahme in der Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zur Beurteilung von morphologischen Veränderungen der Tumorzellen und des Tumorzellstromas	25
Abbildung 4: Detailaufnahme in der Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zur Beurteilung von morphologischen Veränderungen der Tumorzellen und des Tumorzellstromas	26
Abbildung 5: Hyaluronsäuregehalt unter diabetischer und nicht diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Behandlung mit 4-MU	27
Abbildung 6: Vaskularisierung unter diabetischer und nicht diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Behandlung mit 4-MU	29
Abbildung 7: Proliferationsrate unter diabetischer und nicht diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Behandlung mit 4-MU	31
Abbildung 8: Apoptoserate unter diabetischer und nicht diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Behandlung mit 4-MU	33

1 Einleitung

1.1 Ösophaguskarzinom

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Beim Ösophaguskarzinom handelt es sich um den achthäufigsten Tumor weltweit bei rapid ansteigender Inzidenz in den letzten Jahren. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 65. und 70. Lebensjahr, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. Es hat auf Grund der oft spät gestellten Diagnose und des raschen Wachstums eine schlechte 5-Jahres-Überlebensrate mit weniger als 30 %[1].

Histologisch kann man das Ösophaguskarzinom in zwei Arten unterteilen. Zum einen gibt es das Plattenepithelkarzinom, welches aktuell noch die häufigste Art weltweit darstellt und vor allem im asiatischen Raum sehr häufig vorkommt. Zum anderen gibt es das Adenokarzinom, das vor allem im unteren Ösophagus auftritt und in den letzten Jahren stark an Inzidenz zugenommen hat. Es hat in manchen Ländern, wie zum Beispiel den USA oder dem Vereinigten Königreich, das Plattenepithelkarzinom schon als häufigste Art abgelöst. Selten treten andere histologische Arten, wie zum Beispiel das kleinzellige Karzinom oder das Leiomyosarkom, auf[1].

1.1.2 Ätiologie

Es gibt verschiedene Risikofaktoren für die jeweiligen histologischen Typen des Ösophaguskarzinoms. Beim Plattenepithelkarzinom gelten vor allem der Nikotinabusus und der Alkoholmissbrauch als besonders risikoreich. Des Weiteren stellen heiße Getränke, eine Achalasie, eine stattgehabte Bestrahlung des Thoraxbereiches, eine schlechte Mundhygiene sowie ein niedriger sozialer Status mögliche Risikofaktoren dar.

Für das Adenokarzinom ist vor allem die Refluxösophagitis, im Englischen mit *GERD* abgekürzt, der wichtigste Risikofaktor. Außerdem gelten die Barrett-Ösophagitis, Übergewicht und das männliche Geschlecht als risikoreich[1]. Es gibt Studien, die gezeigt haben, dass die Einnahme von ASS und NSAR einen protektiven Einfluss haben sollen[2].

1.1.3 Therapie und Prognose

Als Therapie der Wahl gilt ein multimodales Vorgehen. Die chirurgische Resektion des Tumors steht im Vordergrund. Es gibt dabei verschiedene Operationstechniken. In Deutschland wird vor der Operation häufig eine neoadjuvante Chemotherapie bzw. Radiochemotherapie mit Cisplatin und Fluorouracil bzw. Taxanen durchgeführt. Bei hochgradigen oder lymphknotenpositiven Tumoren wird oft eine Chemotherapie an die Operation angeschlossen. Ist der Tumor nicht operabel, ist eine Radiochemotherapie indiziert. Als palliativer Behandlungsansatz wird eine Chemotherapie oder eine Radiotherapie durchgeführt[3].

Trotz verbesserter OP-Techniken und neuen Chemotherapeutika hat das Ösophaguskarzinom mit ca. 15-25 % eine sehr schlechte 5-Jahresüberlebensrate. Die mittlere Überlebenszeit beträgt neun Monate nach Diagnosestellung und nur sechs Monate bei Lymphknotenbefall[1].

1.2 Diabetes mellitus

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Beim Diabetes mellitus (DM) handelt es sich um eine Stoffwechselerkrankung, die bereits viele Millionen Menschen weltweit betrifft und dessen Inzidenz stetig steigt. In Deutschland sind ca. 6,5 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt[4].

Man unterscheidet verschiedene Diabetes-Typen. Beim Typ I Diabetes kommt es autoimmunbedingt zu einer Zerstörung der β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas, welche für die Insulinproduktion verantwortlich sind. Dadurch kommt es zu einem absoluten Insulinmangel, in Folge dessen Hyperglykämien auftreten können. Er beginnt meistens im Kindesalter und macht in etwa 5-10 % aller Diabeteserkrankungen aus.

Den häufigsten Typ mit ca. 90 % stellt der Typ II Diabetes dar. Dort kommt es durch eine Insulinresistenz der Zellen zu einem relativen Insulinmangel und dadurch bedingt zu Hyperglykämien. Diese Art des Diabetes betrifft vor allem adipöse Patienten und ist häufig mit dem metabolischen Syndrom assoziiert.

Es gibt noch einige andere seltenere Typen, wie zum Beispiel Schwangerschaftsdiabetes, LADA (*latent autoimmune diabetes with onset in adults*) und MODY (*maturity onset diabetes of the young*)[5].

Beim DM kommt es neben den akuten Symptomen im Rahmen einer Hyper- bzw. Hypoglykämie auch zu vielen Späterkrankungen. Durch Makro- und Mikroangiopathien kommt es unter anderem zur diabetischen Retinopathie der Augen, zu Neuropathien sowie zu peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten der Beine und zur Schädigung der Niere. Dies führt letztendlich zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität der Patienten[6].

1.2.2 Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Tumorerkrankungen

Verschiedene neue epidemiologische Studien haben gezeigt, dass es bei Typ I und Typ II Diabetikern zu einem vermehrten Auftreten verschiedener Tumorentitäten[7], wie zum Beispiel dem Pankreaskarzinom[8], kolorektalem Karzinom[9], dem Nieren-[10] und Urothelkarzinom[11] sowie dem Mamma-[12] und Prostatakarzinom[13] kommt. Außerdem hat man beim hepatozellulären Karzinom nicht nur eine erhöhte Inzidenz festgestellt, sondern auch gesehen, dass Patienten mit Hyperglykämien schlechter auf eine Chemotherapie angesprochen haben als Patienten ohne diese[14]. Des Weiteren stellte man bei der Untersuchung des Ösophaguskarzinoms neben dem vermehrten Auftreten des Tumors auch eine erhöhte Mortalität in Relation zum Nüchternblutzucker fest[15, 16].

Der genaue Pathomechanismus ist aktuell noch nicht geklärt. Es gibt mehrere Ansätze, die untersucht werden.

Ein Ansatz ist, dass Patienten mit Typ II Diabetes häufiger adipös sind und somit einen erhöhten Anteil an Fettgewebe aufweisen. Es ist bekannt, dass im Fettgewebe bestimmte Zytokine freigesetzt werden, die neben Entzündungen auch das Tumorwachstum steigern können[17].

Zum andern weiß man, dass es sich bei dem Hormon Insulin, welches eine wichtige Rolle beim DM spielt, um ein anaboles Hormon handelt. Beim Typ II Diabetes kommt es anfangs zu einer reaktiven Insulinerhöhung, während man das Insulin beim Typ I als medikamentöse Therapie verabreicht. Die anabole Wirkung kommt durch verschiedene Effekte des Insulins auf den Glukosestoffwechsel zustande. Zum einen fördert Insulin die Expression der Isoform 4 des Glukose-Transporters (GLUT) in der Zellmembran und somit die Glukoseaufnahme in die Zelle. Dies ist allerdings vor allem für nicht maligne Zellen bekannt[18]. Bei Tumorzellen kommt es häufig eher über die insulinunabhängigen GLUT1/3 zur Glukoseaufnahme[19], wodurch diese unkontrolliert in die Zelle gelangt. Diese Tatsache ist neben der Umstellung der Energiegewinnung von oxydativer Phosphorylierung in den Mitochondrien zur aeroben

Glykolyse ein wichtiger Bestandteil des Warburg-Effekts, der eine entscheidende Rolle bei Tumoren spielt[20, 21]. Für die Umstellung der Energiegewinnung ist typischerweise die Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF-1) mit verantwortlich, da diese dazu führt, dass die Glykolyse-fördernden Transporter GLUT1/3 sowie Hexokinase1-3 vermehrt gebildet werden[22]. Ein weiterer Effekt des Insulins ist die Erhöhung der Metabolisierung von Glukose durch die Glykolyse sowie über den Pentosephosphatweg. Insulin aktiviert durch eine Dephosphorylierung des 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase-1 Proteins (pPFKFB1) die Glykolyse[23]. Außerdem vermittelt es vor allem durch den Subtyp B des Insulinrezeptors und den dadurch nachgeschalteten PI3K/Akt Weg verschiedene metabolische Aspekte, wie zum Beispiel die Proteinsynthese[24]. Eine ebenfalls wichtige Rolle spielt Insulin bei der Proliferation der Zellen. Hierfür wird über den Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK)-Weg, welcher über den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptor (IGFR) aktiviert wird, die ExtrazellulärSignal-regulierte Kinase (ERK) in Gang gesetzt. Diese stimuliert verschiedene Wachstumsprozessen in der Zelle[24, 25]. Man hat festgestellt, dass die Aktivität des IGF-1 Weges mit der Expression des Insulinrezeptor Typ A korreliert. Dieser kommt vor allem in Tumorzellen vermehrt vor, sodass die Proliferation gegenüber den metabolischen Aspekten in den Tumorzellen überwiegt[26].

Der letzte Ansatz beschäftigt sich mit der Tatsache, dass es beim Diabetes häufiger zu Hyperglykämien kommt. Dadurch steht der Zelle mehr Glukose zur Verfügung, die sie zum einen für eine vermehrte Synthese von Hyaluronsäure nutzen kann, welche tumorprogressionsfördernde Eigenschaften aufweist. Zum anderen wird durch die Glukose die ATP-Bildung gesteigert, wodurch der Zelle mehr Energie zum Wachstum bereitsteht. Außerdem weiß man, dass Tumorzellen durch die metabolische Umstellung der Energiegewinnung auf die aerobe Glykolyse auf eine hohe Glukose-Versorgung angewiesen sind, welche ihnen bei Hyperglykämien vermehrt zur Verfügung steht[20, 21]. Neben der erhöhten Energiegewinnung werden durch eine Hyperglykämie auch noch einige andere Signalwege induziert, die eine Rolle bei der Proliferation und Invasion spielen[27, 28]. In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen existieren Daten darüber, dass eine erhöhte Expression von GLUT1 bei Patienten mit Ösophaguskarzinom mit einer schlechten Prognose einhergeht[29].

1.3 Hyaluronsäure

1.3.1 Struktur und Synthese

Bei der Hyaluronsäure (HA) handelt es sich um ein makromolekulares Glykosaminoglykan, welches als lineares, langkettiges Polysaccharid vorliegt. Es wird aus den Glukosederivaten D-Glukuronsäure und D-N-Acetylglukosamin synthetisiert, die in der Frühphase der Glykolyse entstehen. Für die Synthese sind drei Isoformen der Hyaluronsäuresynthase (HAS 1, 2 und 3) notwendig, die sich in der Membran der Zelle befinden und dort die Monosaccharide miteinander verknüpfen und die fertige HA in den extrazellulären Raum transportieren[30]. Für den Abbau der HA werden Isoformen der Hyaluronidase benötigt, welche diese in Di- bzw. Tetrasaccharide aufspalten und zu den Lysosomen transportieren, wo sie endgültig abgebaut werden.

Da HA aus Glukosederivaten synthetisiert wird, lässt sich vermuten, dass die Hyaluronsäuresynthese vom Glukoseangebot abhängig ist. Das würde bedeuten, dass es bei einer Hyperglykämie zu einer vermehrten Hyaluronsäurebildung kommt. Bisher wurde *in vivo* Versuchen gezeigt, dass bei diabetischen Ratten[31] und Patienten mit Typ I Diabetes[32] erhöhte Hyaluronsäurewerte im Blut nachweisbar sind.

1.3.2 Vorkommen und Funktion

HA ist neben Kollagen ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix. Je nach Kettenlänge erfüllt sie unterschiedliche Funktionen.

Die hochmolekulare HA (2×10^3 - 10^5 Saccharid-Einheiten, m_M 4×10^2 - 2×10^4 kDa), die beim Menschen vorkommt, kann auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften sehr viel Wasser binden und dient somit unter anderem der Wasserspeicherung[33]. Dieser Effekt ist vor allem im Glaskörper des Auges zu sehen, der aus 98 % Wasser und nur 2 % HA besteht. Die HA hat daneben noch viele andere Funktionen und kommt in einem großen Anteil beispielsweise in der Haut, in der Synovia[34], im Nucleus pulposus[35] und im Gehirn vor.

Liegt die HA lediglich in Fragmenten vor, hat sie gesonderte Eigenschaften. Sie fördert unter anderem die Migration von Zellen[33], indem sie die Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM anregt, die eine wichtige Rolle bei der Migration spielen[36]. Der CD44-Rezeptor kommt unter anderem auf Tumorzellen vor und sorgt als Adhäsionsmolekül sowohl für die

Anheftung der Zelle an einem bestimmten Ort als auch für deren Migration. Außerdem löst er den Phosphoinositid-3-Kinase (PIK3)-Proteinkinase B (AKT)-Weg aus, welcher für die Invasion, Adhäsion, Proliferation und Anti-Apoptose von Zellen wichtig ist[37]. RHAMM kommt unter anderem in der Zellmembran und im Zytoplasma von Tumorzellen vor. Es bewirkt ebenfalls eine Adhäsion der Zellen und beeinflusst die Migration[36]. Durch diese Mechanismen kommt es nicht nur zu einem erhöhten Tumorwachstum, sondern auch zu einer erhöhten Metastasierung.

Inzwischen wurden auch langkettigere Formen der HA gefunden, welche zum Beispiel bei Nacktmullen vorhanden sind und dort teilweise gegensätzliche Funktionen und Eigenschaften zur menschlichen HA aufweisen[38].

1.3.3 Einfluss auf die Tumorprogression

Eine tumorprogressionsfördernde Eigenschaft von HA ist die Steigerung der Angiogenese von Tumoren. Über die Hyaluronsäure-abbauenden Enzyme Hyaluronidase (HYAL) 1-3 wird die HA in die aktiven niedermolekularen Hyaluronsäuremoleküle zerlegt. Diese begünstigen unter anderem durch die Stimulation von Endothelzellen die Angiogenese und Neovaskularisierung. Daneben unterstützen sie die Zellmigration und wirken anti-apoptotisch[39].

Des Weiteren bilden Tumorzellen einen Mantel aus HA, der vor exogenen Noxen, wie zum Beispiel Chemotherapeutika, schützen kann. Um die Wirkung von Chemotherapeutika zu erhöhen, wird deshalb seit langem Hyaluronidase eingesetzt, die diesen Mantel zerstören soll[40].

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass es bei einer erhöhten Expression der Hyaluronsäuresynthasen 2 und 3 zu einer vermehrten Metastasierung und einer höheren Malignität bei verschiedenen Tumorarten kommt[41-43].

1.4 4-Methylumbelliferon

1.4.1 Struktur und Wirkmechanismus

Das oral verfügbare 4-MU ist ein Derivat des Umbelliferons, welches an Position 4 des Ringgerüsts methyliert ist. Bei Umbelliferon handelt es sich wiederum um ein, in der Natur vorkommendes, Hydroxy-Derivat des Kumarins.

4-MU inhibiert die Hyaluronsäuresynthese. Es wird an Stelle von Uridindiphosphat (UDP) durch die UDP-Glukuryltransferase, welche für die Bildung der aktivierten Formen UDP-N-Azetylglukosamin und UDP-Glukuronsäure wichtig ist, an Glukuronsäure gebunden. Somit entsteht 4-MU-Glukuronsäure und die zelluläre Konzentration von UDP-Glukuronsäure wird gesenkt und somit letztendlich auch die Hyaluronsäuresynthese[44].

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass 4-MU zum einen die Apoptose beim Prostatakarzinom[45] einleitet und zum anderen die Metastasierung bei Melanomen reduziert[46]. Außerdem wird die Ansprechrate von Chemotherapeutika bei Pankreas- und Mammakarzinomen erhöht[47, 48]. Beim Ösophaguskarzinom verringert es die Zellproliferation[49].

1.4.2 Einsatz in der Medizin und Nebenwirkungen

4-MU wird seit den 80er Jahren auf Grund seiner spasmolytischen und choloretischen Wirkung zur Linderung von Spasmen bei Gallenwegskoliken eingesetzt. Dabei werden Tagesdosen von 1200 mg (3x400mg) pro Tag als Tabletten eingenommen. Trotz dieser vergleichsweise hohen Dosis sind keine schwerwiegenden Nebenwirkungen bekannt, was für eine sehr gute Verträglichkeit spricht. Als leichte Nebenwirkung kann es unter anderem zur Xerodermie kommen, da der Haut weniger wasserbindende HA zur Verfügung steht[50].

1.5 Zusammenhang zwischen Diabetes, Hyaluronsäure und Tumorprogression

Durch die Tatsache, dass die HA als tumorprogressionsfördernd gilt, könnte man vermuten, dass eine Hyperglykämie im Rahmen einer Insulinresistenz über eine gesteigerte Hyaluronsäuresynthese mit dazu beiträgt, dass Tumorzellen aggressiver und Chemotherapie-resistenter werden. Es gibt bereits erste Arbeiten, welche gezeigt haben, dass Hyperglykämien einen Einfluss auf die Hyaluronsäuresynthese haben. Allerdings weiß man noch nicht genau, welche Auswirkungen diese Hyperglykämie und der damit verbundene erhöhte Hyaluronsäuregehalt auf das Tumorstadium und andere Tumoreigenschaften haben[51].

1.6 Ziel der Arbeit

Man weiß, dass sowohl ein hoher Hyaluronsäuregehalt als auch eine Hyperglykämie sich fördernd auf das Tumorwachstum und die Metastasierung auswirken.

Durch die Arbeit sollen die bereits *in vitro* erhobenen Vorbefunde auch *in vivo* bestätigt werden. Dafür werden folgende Ziele verfolgt:

1. Es wird der Hyaluronsäuregehalt der Tumorzellen im Rahmen von einer Hyperglykämie untersucht.
2. Zudem wird der Einfluss des erhöhten Hyaluronsäuregehaltes auf das Tumorwachstum, die Neoangiogenese, Zellproliferation und Apoptose von Tumorzellen analysiert.
3. Als letztes wird der Einfluss von 4-MU auf den Hyaluronsäuregehalt und die damit verbundenen Tumoreigenschaften untersucht.

Stellt sich heraus, dass es durch eine diabetische Stoffwechsellage zu einem erhöhten Hyaluronsäuregehalt und somit zur Steigerung bestimmter Tumoreigenschaften kommt, könnte dies ein neuer Therapieansatz für Tumorpatienten mit DM sein. Eine Möglichkeit wäre dann die therapeutische Behandlung mit 4-MU.

2 Material und Methoden

2.1 Substanzen

Substanz	Hersteller und Lotnummer
Azeton $\geq 99,5$ % zur Synthese	Carl Roth, Karlsruhe, D, LOT:425234935
Avidin-Biotin-Block	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA LOT:ABB130724
Deionisiertes Wasser	Milli-Q Biocel, Millipore, Darmstadt, D
Ethanol absolut $\geq 99,8$ %	Carl Roth, Karlsruhe, D, LOT:465236597
Eosin Y, Dinatriumsalz	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA LOT:MKBG4746V
10 % Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D, LOT:092183863
Hämalaun-Lösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, D, LOT:171171289
10 % HCl	Carl Roth, Karlsruhe, D, LOT:401177782
RotiClear	Carl Roth, Karlsruhe, D, LOT:146241872
RotiMount FluoCare DAPI	Carl Roth, Karlsruhe, D, LOT:414220451
RotiMount Xylol- und Toluolfrei (für Hämalaun-Eosin-Färbung)	Carl Roth, Karlsruhe, D, LOT:335233179

Tabelle 1: Substanzen

2.2 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung bzw. Hersteller
Aqua dest.	Aus dem eigenen Labor
Blockierungspuffer	10 % 10xTBS+ 10 % FCS+ 1 % BSA
Bovine Serum Albumin (BSA) 98 %	Sigma Aldrich,St.Louis,MO,USA LOT:017K0725
Ethanol 70 % und 95 %	Aus Ethanol absolut verdünnt
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA, USA
4 % Formalin	Aus 10 % Formaldehyd hergestellt
1 % HCl	Aus 10 % HCl verdünnt
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
10xTBS	Tris 24,2 g NaCl 80,8 g Ad 1 Liter pH 7,6

Triton X-100	Sigma Aldrich,St.Louis,MO,USA, LOT:67H0044
--------------	---------------------------------------------------

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

2.3 Antikörper und TUNEL-Kit

2.3.1 Hyaluronsäure-Zytokeratin18-Färbung

Name	Hersteller	Verdünnung
Hyaluronsäurebindeprotein (HABP),biotinyliert	Calbiochem,Merck, Darmstadt,D LOT:DOO159600	1: 100
Streptavidin-Cy3	Caltag Buckingham,UK LOT:0200B	1: 200

Tabelle 3: Substanzen HA-Färbung

Antikörper	Name	Hersteller	Verdünnung
Primärantikörper	<i>guinea pig polyclonal anti-CK18</i>	Progen,Heidelberg,D LOT:311181	1: 100
Sekundärantikörper	<i>goat anti guinea pig FITC IgG (H+L)</i>	Jackson Immuno Research,West Grove,PA,USA LOT:76840	1: 200

Tabelle 4: Antikörper CK18-Färbung

2.3.2 CD31-Färbung

Antikörper	Name	Hersteller	Verdünnung
Primärantikörper	<i>rat anti-CD31</i> (ab7388)	Abcam,Cambridge, UK LOT:GR 738361	1: 50
Sekundärantikörper	<i>anti-rat rhodamine</i> <i>red x</i>	Jackson Immuno Research,West Grove,PA,USA LOT:112295167	1: 200

Tabelle 5: Antikörper CD31-Färbung

2.3.3 Ki67-Färbung

Antikörper	Name	Hersteller	Verdünnung
Primärantikörper	<i>rabbit anti-Ki67</i> Novus	Novus,Littleton,USA LOT:G011	1: 25
Sekundärantikörper	<i>goat anti-rabbit</i> Alexa Fluor 568	Abcam,Cambridge, UK LOT:1504529	1: 200

Tabelle 6: Antikörper Ki67-Färbung

2.3.4 TUNEL-Färbung

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[52].

2.4 Geräte und Materialien

Gerät/ Material	Gerätebezeichnung	Hersteller und Lotnummer
Deckgläschen	Cover Slips 24x50 mm	Engelbrecht Medizin-und Labortechnik, Edermünde, D
Einbettmedium	KP-Cryo Compound	Klinipath, Duiven, NL LOT:0801151620C
Fettstift	<i>Liquid Blocker</i>	Daido Sangyo Co, Ltd, Japan
Gefrierschrank	Forma 900 series	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Kryokasten	Disposable base mold	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA LOT:6235215
Kryostat	Leica CM 3050 S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
Mikroskop	Axio Imager M2	Zeiss, Oberkochen, D
Mikroskopkamera	Axio Cam HRC	Zeiss, Oberkochen, D
Nagellack	Essence	Cosnova GmbH, Sulzbach, D
Objektträger	Super Frost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, D
Pipetten mit Pipettenspitzen		Eppendorf, Hamburg, D

Kieselerdekugeln für Objektträgerbox	<i>Silica</i> Gel orange 2-5 mm mit Indikator	Carl Roth, Karlsruhe, D LOT:505237168
Wasserbad	Typ 1004	Gesellschaft für Labor-technik, Burgwedel, D
Zentrifuge	Mini Spin plus	Eppendorf, Hamburg, D

Tabelle 7: Geräte und Materialien

2.5 Crl:NMRI-Foxn1^{nu} Mäuse

Für das Experiment wurden homozygote Crl:NMRI-Foxn1^{nu} Mäuse aus dem Charles River Laboratorium (Wilmington, MA, USA) benutzt, da diese im Vergleich zu anderen Mäusen die Induktion einer diabetischen Stoffwechsellaage durch Streptozotocin besser tolerieren[53].

Das Besondere an den Mäusen ist ein durch eine Mutation im Foxn-1 Gen bedingtes Fehlen des Thymus und des Fells. Durch das Fehlen des Thymus werden weniger T-Lymphozyten als beim Wildtyp produziert, was dazu führt, dass die Aktivität des Immunsystems der Mäuse herabgesetzt ist. Die B-Lymphozyten sind nicht betroffen. Durch das herabgesetzte Immunsystem eignen sich die Mäuse sehr gut für Experimente mit Xenograft-Tumoren, da es zu keiner Abstoßungsreaktion kommt.

2.6 Trinkwasser und Futter

Die Mäuse bekamen keimfreies Wasser. Bei der Bestimmung der Trinkmenge ging man davon aus, dass eine Maus 1,5 ml pro 10 g Körpergewicht pro Tag trinkt. Das mittlere Gewicht einer Maus betrug 30 g, sodass sich eine Gesamttrinkmenge von 4,5 ml pro Tag pro Maus ergab.

Als Futter wurde das Standardfutter V1244 für Nacktmäuse von Ssniff[54] benutzt, wobei bei der Hälfte der Mäuse zusätzlich 4-MU von Sigma-Aldrich ins Futter gemischt wurde. Bei der Festsetzung der 4-Methylumbelliferon-Menge ging man davon aus, dass eine Maus pro Tag 1,5 g pro 10 g Körpergewicht pro Tag isst. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 30 g pro Maus ergab das eine Futtermenge von 4,5 g pro Maus pro Tag. Es wurden 50 mg 4-MU pro g

Futter beigefügt. Das ergab eine Gesamtmenge des aufgenommenen 4-MU von 225 mg/Tag pro Maus.

2.7 OSC-1 Zellen

Humane OSC-1 Zellen sind eine Ösophaguskarzinomzelllinie, die aus von Patienten resezierten Plattenepithelkarzinomen isoliert wurden. Sie werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verwendet. *In vitro* wachsen sie zuerst in isolierten epithelialen Zellnestern, bevor sie sich kopfsteinpflasterartig zusammenlagern. Sie wurden erstmals von Sarbia et al. beschrieben[55]. Das Tumorgewebe stellt sich *in vivo* als niedrig differenziertes, solides Karzinom mit einem aggressiven Wachstumsverhalten dar. Bei Voruntersuchungen ließen sich keine makro- oder mikroskopischen Metastasen feststellen.

2.8 Nacktmaus-Xenograft-Modell

Die Tierversuche wurden im ZETT der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch meinen Betreuer Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock durchgeführt und vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV), NRW, unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2013.A471 genehmigt.

Im Alter von 8 Wochen wurden der Hälfte der Crl:NMRI-Foxn1tm Mäuse Streptozotocin in einer Dosis von 240 mg/kg Körpergewicht injiziert. Bei Streptozotocin handelt es sich um ein Chemotherapeutikum, das kovalent mit Glukose verbunden ist. Dies führt dazu, dass es über den GLUT2 Transporter in das Pankreas aufgenommen wird und dort die β -Zellen zerstört. Dadurch wird eine dem Typ I Diabetes entsprechende Stoffwechsellage induziert. Die andere Hälfte der Mäuse blieb als Kontrollgruppe unbehandelt. Der Blutzucker wurde durch Blut aus der Schwanzspitze gemessen. Sobald bei allen diabetischen Mäusen ein Blutzucker zwischen 400 und 600 mg/dl gemessen wurde, wurden sowohl der Hälfte der diabetischen als auch der Hälfte der Kontrollmäuse der Hyaluronsäure-Inhibitor 4-MU verabreicht. Das 4-MU wurde in einer Dosis von 225 mg pro Tag pro Maus in das Futter gemischt. Zwei Tage später wurde jeder Maus eine Anzahl von 1×10^6 OSC-1 Zellen in beide Flanken injiziert. Sobald ein Wachstum sichtbar war, wurde das Volumen des Tumors mittels Schiebelehre gemessen und mit Länge x Höhe x Tiefe x 0,52 berechnet[56]. Die Mäuse wurden insgesamt über neunzig Tage beobachtet.

2.9 Gewebeentnahme

Nach neunzig Tagen wurde das Projekt beendet und die Tumore durch Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock entnommen. Anschließend wurden diese in mit TissueTek gefüllte CryoMolds gegeben und in Isopentan bei -40 °C eingefroren. Die endgültige Lagerung erfolgte in einem -80 °C Gefrierschrank.

2.10 Anfertigung der Kryoschnitte

Vor Anfertigung der Schnitte wurden die eingebetteten Tumorblöcke aus dem -80 °C Gefrierschrank genommen und auf -20 °C erwärmt. Danach wurden sie auf einen vorgekühlten Kryostatenstempel mittels Einbettmedium befestigt und im Kryostaten eingespannt. Anschließend wurde durch Verstellen der Stellschrauben die richtige Position des Blockes bestimmt und bis zum Gewebe geschnitten. Es wurden jeweils $8\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte bei -23 °C angefertigt und jeweils zwei Konsekutivschnitte auf einen Objektträger gebracht, der beschriftet wurde. Anschließend wurden die Objektträger kurz mittels Föns getrocknet und dann in die vorgesehenen Objektträgerboxen sortiert. Bevor die Boxen mit den Schnitten bei -80 °C aufbewahrt wurden, wurde noch ein Beutelchen aus Zellstoff mit Silica Gel gefüllt und beigelegt, wodurch die Schnitte vor eventuell entstehender Feuchtigkeit geschützt wurden.

2.11 Hämalaun-Eosin-Färbung

Bei der Hämalaun-Eosin-Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung durch die man die Morphologie der Zellen, wie z.B. die Zellkerne oder das Kern-Zytoplasma-Verhältnis, untersuchen kann.

Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt: Zuerst erfolgte eine fünfzehnminütige Fixierung mit 10 % Formalin bei 4 °C . Danach wurden die Schnitte zweimal jeweils für fünf Minuten in 1x PBS gewaschen. Für die Färbung selbst wurden die Schnitte zuerst eine Minute lang in Aqua dest. getaucht. Danach kamen sie für ebenfalls eine Minute in Hämalaun, wodurch die sauren, basophilen Strukturen, wie zum Beispiel die Zellkerne, angefärbt wurden. Als nächstes erfolgte jeweils eine kurze Waschung mit Leitungswasser und 1 % HCl. Danach erfolgte ein fünfminütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser, wodurch der pH-Wert erhöht wurde. Als letzter Schritt der Färbung wurden die Schnitte für eine Minute in 1 % Eosin getaucht, um

das Zytoplasma anzufärben. Vor dem Eindecken wurde eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70 %, 95 % und absoluten Ethanol benutzt, wodurch das Wasser aus den Schnitten verdrängt wurde. Außerdem wurden die Schnitte fünfminütig in RotiClear getaucht. Zum Eindecken wurde RotiMount benutzt.

2.12 Immunhistochemische Färbungen

2.12.1 Hyaluronsäure-Zytokeratin18-Färbung

Die Hyaluronsäure-Zytokeratin18-Doppelfärbung dient zum Vergleich des Hyaluronsäuregehaltes der Tumoren in den einzelnen Gruppen.

Zunächst wurden die Schnitte zehn Minuten lang in Aceton bei 4 °C fixiert. Danach erfolgte dreimalig eine Waschung für jeweils fünf Minuten mit 1x PBS. Als nächstes wurde der Avidin-Biotin-Block durchgeführt. Es kommt dabei zu einer Bindung zwischen Avidin und Biotin, wodurch unspezifische Reaktionen mit biotinähnlichen Strukturen vermieden werden sollen. Dabei wurden die Schnitte für zehn Minuten mit Avidin bedeckt und dann für fünf Minuten mit 1x PBS gewaschen. Danach wurde Biotin für ebenfalls zehn Minuten auf die Schnitte gegeben und dann mit 1x PBS fünf Minuten lang gewaschen. Als nächstes kamen sie für eine Stunde in die oben genannte Blockierungslösung. Für die Hyaluronsäurefärbung wurde biotinyliertes HABP (s. Tabelle 3) mit der Verdünnung 1:100 in 1 % BSA in 1x PBS aufgelöst und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Bei HABP handelt es sich um eine Protease, die an HA bindet. Danach wurden die Schnitte dreimalig für fünf Minuten mit 1x PBS gewaschen. Als nächstes wurde für die Hyaluronsäurefärbung Streptavidin-Cy3 (s. Tabelle 3) in 1x PBS mit der Verdünnung 1:200 aufgelöst und für eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit in einer feuchten Kammer inkubiert. Bei Streptavidin handelt es sich um ein Protein, welches an biotinylierte Moleküle bindet. Es folgte eine dreimalige Waschung für jeweils fünf Minuten mit 1x PBS. Danach wurde als Primärantikörper für die Zytokeratin18-Färbung *guinea pig polyclonal anti-CK18* (s. Tabelle 4) mit der Verdünnung 1:100 in 1 % BSA in 1x PBS aufgelöst, welches an das Zytokeratin18 bindet, und für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hier nach wurden die Schnitte dreimalig gewaschen. Als letzter Antikörper wurde der Sekundärantikörper für die Zytokeratin18-Färbung *goat anti guinea pig FITC* (s. Tabelle 4) mit der Verdünnung 1:200 in 1x PBS aufgelöst und ebenfalls für eine Stunde bei

Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte noch ein letztes Mal wie oben beschrieben gewaschen. Zum Eindecken wurde RotiMount FluoCare DAPI benutzt, wodurch die doppelsträngige DNA angefärbt wurde.

2.12.2 CD31-Färbung

CD31 ist ein endothelialer Marker. Bei dieser Färbung werden CD31 positive Areale angefärbt, hierdurch kann man die Tumorangio-genese der einzelnen Gruppen unter-einander vergleichen.

Vor der Färbung wurde eine zehnmünütige Fixierung mit Aceton bei 4 °C durchgeführt. Danach wurden die Schnitte dreimal für jeweils fünf Minuten mit 1x PBS gewaschen. Als nächstes wurden sie für eine Stunde in eine Blockierungslösung gegeben. Für die Färbung wurde der Primärantikörper *rat* anti-CD31 (s. Tabelle 5) mit der Verdünnung 1:50 in 1 % BSA in 1x PBS aufgelöst und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Antikörper bindet an die CD31-Rezeptoren auf Endothelzellen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für jeweils fünf Minuten mit 1x PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper Anti-*rat* Rhodamine Red X (s. Tabelle 5) wurde mit der Verdünnung 1:200 in 1x PBS aufgelöst und für eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach erfolgte wieder eine dreimalige Waschung mit 1x PBS für jeweils fünf Minuten. Zum Eindecken wurde RotiMount FluoCare DAPI benutzt, um die doppelsträngige DNA anzufärben.

2.12.3 Ki67-Färbung

Bei Ki67 handelt es sich um ein Protein, das nur in der Interphase und nicht in der Ruhephase der Zellteilung anfärbbar ist, wodurch die Proliferationsrate des Tumors bestimmen werden kann.

Bei der Färbung wurden die gleichen Schritte durchgeführt wie bei der CD31-Färbung. Der Primärantikörper Ki67 (s. Tabelle 6) wurde mit der Verdünnung 1:25 in 1 % BSA in 1x PBS aufgelöst und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Der Antikörper bindet an das Ki67-Protein der Zellen, die sich in der Zellteilung befinden. Als Sekundärantikörper wurde *goat* anti-*rabbit* Alexa Fluor 568 (s. Tabelle 6) mit der Verdünnung 1:200 in 1x PBS aufgelöst und für eine Stunde bei Dunkelheit ebenfalls in einer feuchten Kammer inkubiert. Eingedeckt wurde mit RotiMount FlouCare DAPI, wodurch die Zellkerne angefärbt wurden.

2.12.4 TUNEL-Färbung

Bei der TUNEL-Färbung werden Zellen angefärbt, die sich in Apoptose befinden.

Für die TUNEL-Färbung wurden die Schnitte zuerst für fünfzehn Minuten in 4 % PFA bei 37 °C fixiert. Danach folgte eine zweimalige Waschung für jeweils fünf Minuten in 1x PBS. Als nächstes wurde die Proteinkinase K (s. Anhang) zum Permeabilisieren auf die Schnitte gegeben und für fünfzehn Minuten in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte für fünf Minuten in 1x PBS gewaschen. Es schloss sich eine zweite Fixierung mit 4 % PFA für fünf Minuten bei 37 °C an. Dann wurden die Schnitte wieder für zwei Mal fünf Minuten in 1x PBS gewaschen und einmal kurz in deionisiertes Wasser getaucht.

Für die benötigte Positivkontrolle wurde ein Schnitt für dreißig Minuten bei Raumtemperatur mit 1U DNase1 behandelt und mit deionisiertem Wasser gewaschen. Bei DNase1 handelt es sich um ein Enzym, welches DNA zerschneidet. So erhält man ausreichend freie 3'-Enden, die mit der TUNEL-Färbung nachweisbar sind.

Für die TdT Reaktion wurden je 100 µl TdT *reaction buffer* (s. Anhang) auf jeden Schnitt aufgebracht und für zehn Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als nächstes wurde der Puffer abgeschüttelt und 50 µl TdT *reaction mixture* (s. Anhang) auf jeden Schnitt pipettiert und für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Schnitte kurz in deionisiertem Wasser getaucht und für fünf Minuten in 3 % BSA mit 0,1 % Triton X-100 in PBS gewaschen. Daraufhin wurden sie nochmal kurz in 1x PBS getaucht. Für die Click-IT Plus Reaktion wurde aus den Komponenten des Kits der Click-IT Plus TUNEL *reaction cocktail* hergestellt (s. Anhang). Davon wurden jeweils 50 µl auf jeden Schnitt getan und dreißig Minuten lang bei 37 °C lichtgeschützt in einer feuchten Kammer inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte mit 3 % BSA in 1x PBS fünfminütig gewaschen. Zum Abschluss wurden sie nochmal kurz in 1x PBS getaucht. Zum Eindecken wurde RotiMount FluoCare DAPI benutzt.

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

2.13 Auswertungsvorgehen

2.13.1 Auswertung der Hämalaun-Eosin-Färbung

Mit der Hämalaun-Eosin-Färbung wurden morphologische Veränderungen, wie zum Beispiel ein unterschiedliches Zytoplasma-Zellkern-Verhältnis oder Veränderungen des Zellkernes, innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen untersucht.

Zur Auswertung wurden die Präparate mittels eines Durchlicht-Mikroskops in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen. Mit dem 2,5er Objektiv wurde der gesamte Tumor zur Übersicht aufgenommen. Danach wurden pro Präparat fünf Fotos mit dem 20er Objektiv und drei Fotos mit dem 40er Objektiv aufgenommen und ausgewertet. Die Belichtungszeit war bei allen Aufnahmen gleich.

2.13.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mittels Mikroskops

Für die Aufnahme der immunhistochemischen Färbungen wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop verwendet. Für die Auswertung der angefertigten Bilder wurden die Computer-programme Fiji, eine Erweiterung von ImageJ, und GraphPad Prism6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet.

2.13.2.1 Auswertung der Hyaluronsäure und Zytokeratin18-Färbung

Es wurden insgesamt pro Präparat zwei Bilder mit dem 20er Objektiv und fünf Bilder mit dem 40er Objektiv aufgenommen und ausgewertet. Dabei blieb die Belichtungszeit konstant.

Bevor die angefertigten Bilder zur Auswertung mit Fiji genutzt werden konnten, mussten diese zuerst in das TIF-Format gebracht werden. Dies erfolgte durch die AxioVision Rel. 4.8. Danach wurde mit ImageJ ein 8-Bit-Bild erstellt. Es wurde ein Makro erstellt, wodurch alle Bilder dieser Färbung automatisiert analysiert wurden. Bei der Auswertung wurde nicht nur die Fläche, sondern auch die Intensität gemessen und berechnet. Die ermittelten Werte wurden dann durch GraphPad statistisch ausgewertet und in Graphen dargestellt.

2.13.2.2 Auswertung der CD31-Färbung

Pro Präparat wurden fünf Bilder mit dem 10er Objektiv und jeweils ein Bild mit dem 20er Objektiv aufgenommen und ausgewertet. Die Belichtungszeit blieb konstant.

Auch hier wurden die Bilder zunächst in das TIF-Format transferiert. Danach wurde eine Bilddatei mit Fiji geöffnet und in einen 8-Bit Farbkanal umgewandelt. Es wurde ebenfalls ein Makro erstellt, wobei der *Autothreshold* „Li“ als am geeignetsten festgelegt wurde. Auch hier wurde neben der Fläche zusätzlich die Intensität mit eingerechnet. Die ermittelten Mittelwerte eines jeden Tumors wurden dann durch GraphPad statistisch ausgewertet und in Graphen dargestellt.

2.13.2.3 Auswertung der Ki67-Färbung

Insgesamt wurden pro Präparat zwei Bilder mit dem 10er Objektiv und fünf Bilder mit dem 20er Objektiv aufgenommen. Die Belichtungszeit war konstant.

Die Schritte vor der eigentlichen Auswertung entsprechen denen der anderen Färbungen. Das Besondere an dieser Färbung war, dass dem Makro neben dem *Autothreshold* „Li“ die Funktion *Watershed* hinzugefügt wurde, wodurch einzelne Zellkerne besser erkannt wurden. Danach wurden die Partikel analysiert und die Anzahl der Zellkerne bestimmt. Die ermittelten Mittelwerte eines jeden Tumors wurden dann mit GraphPad statistisch ausgewertet und in Graphen dargestellt.

2.13.2.4 Auswertung der TUNEL-Färbung

Es wurden zwei Bilder mit 10er Objektiv und fünf Bilder mit 20er Objektiv aufgenommen. Dabei war die Belichtungszeit vergleichbar.

Die Auswertung erfolgte analog zur Ki67-Färbung.

2.13.3 Statistik

Zur Auswertung der Daten wurde die Software GraphPad Prism 6 (s.o.) verwendet. Bei zwei Datensätzen wurde der t-Test, bei mehr als zwei Datensätzen wurde die Varianzanalyse (ANOVA) mit nachgeschaltetem post-hoc-Test nach Tukey (Vergleich aller Daten untereinander) oder Sidak (Vergleich aller Daten mit einer Kontrolle) benutzt.

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

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde bei einem Wert $P < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Diabetes und 4-Methylumbelliferon auf das Tumorstadium sowie das Überleben

Schon makroskopisch zeigten sich nach den neunzig Tagen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Aus den von Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock gemessenen Volumina der Tumore wurden folgende Wachstumskurven erstellt.

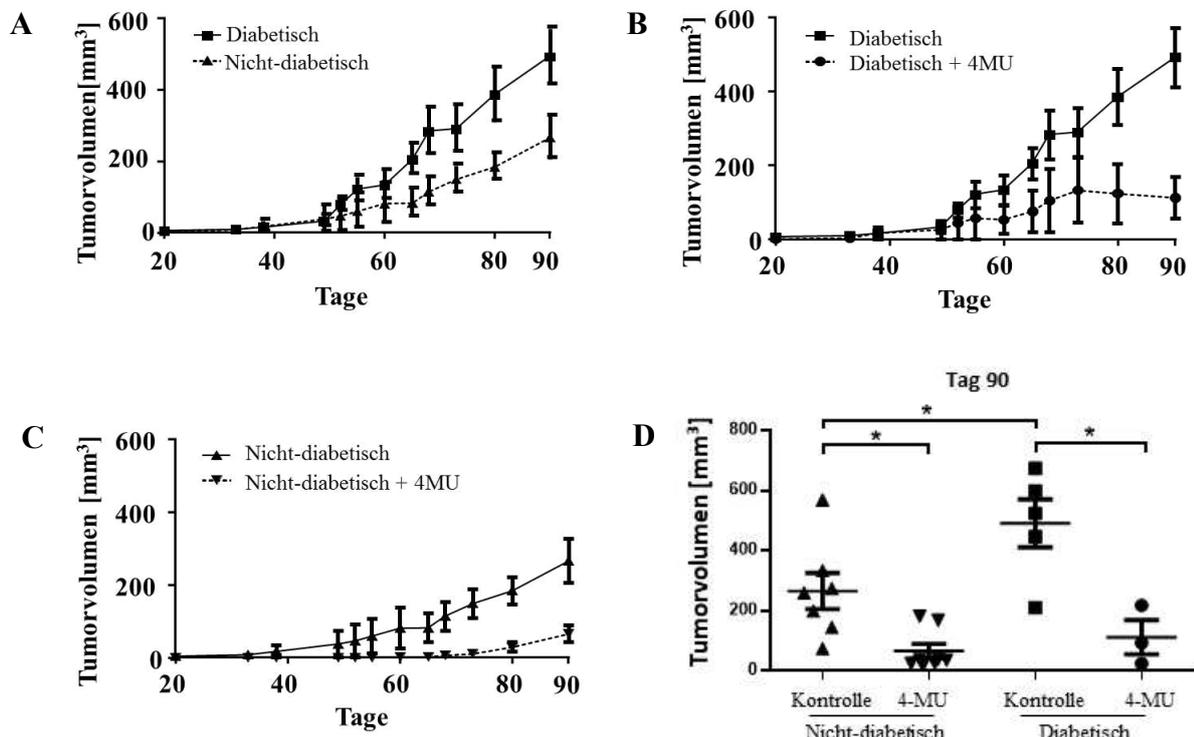


Abbildung 1: Tumorwachstum unter diabetischer und nicht diabetischer Stoffwechsellaage mit und ohne Behandlung mit 4-MU

A Unter einer diabetischen Stoffwechsellaage war nach 90 Tagen ein durchschnittlich größeres Tumorstadium ersichtlich als unter einer nicht diabetischen Stoffwechsellaage. *Tumore aus diabetischen Tieren n=8, Tumore aus nicht-diabetischen Tieren n=9.*

B Bei dem Vergleich der reinen Diabetesgruppe mit der Diabetesgruppe, die 4-Methylumbelliferon (4-MU) erhalten hatte, zeigte sich, dass die Tumorstadien der behandelten Diabetesgruppe signifikant kleiner waren als die in der unbehandelten Gruppe. *Tumore aus diabetischen Tieren n=8, Tumore aus diabetischen Tieren +4MU n=6*

C Bei der nicht-diabetischen Gruppe, welche mit 4-MU behandelt wurde, waren die Tumorstadien ebenfalls signifikant geringer als in der unbehandelten Gruppe. *Tumore aus nicht-diabetischen Tieren n=9, Tumore aus nicht-diabetischen Tieren +4MU n=8*

D An Tag 90 konnte ein signifikant erniedrigtes Tumorstadium bei den jeweils mit 4-MU behandelten Mäusen festgestellt werden. Zudem war das Tumorstadium in den diabetischen Gruppen signifikant größer als in den jeweiligen nicht-diabetischen Gruppen. *Tumore aus diabetischen Tieren n=8, Tumore aus diabetischen Tieren+4MU n=6, Tumor aus nicht-diabetischen Tieren n=9, Tumore aus nicht-diabetischen Tieren+4MU n=8. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$*

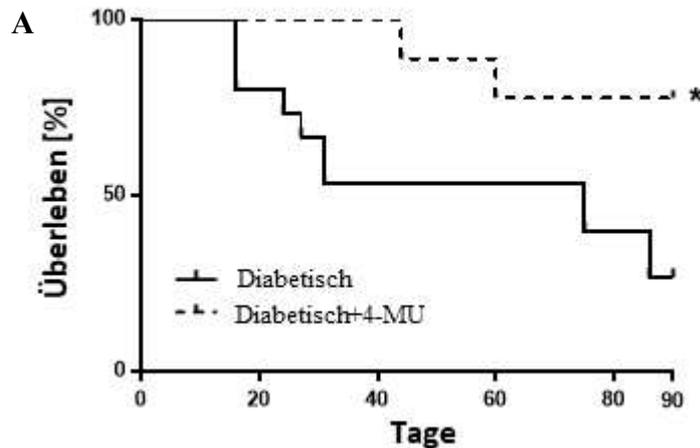


Abbildung 2: Überlebensrate der diabetischen Tiere mit und ohne 4-MU-Behandlung

Kaplan-Meier-Kurve der Überlebensrate der unbehandelten und mit 4-Methylumbelliferon (4-MU) behandelten diabetischen Nacktmäuse innerhalb von 90 Tagen nach Xenotransplantation. Es wurden fünfzehn unbehandelte diabetische sowie neun diabetische Mäuse, welche mit 4-MU behandelt worden, betrachtet. Am Ende des Experiments lebten noch vier diabetische Mäuse und sieben mit 4-MU behandelte diabetische Mäuse. Log-rank-Test (Mantel-Cox): *, $p < 0.05$.

Vergleicht man die Wachstumskurven untereinander, fällt auf, dass unter einer diabetischen Stoffwechsellage sowohl bei den unbehandelten als auch bei den mit 4-MU behandelten Mäusen ein signifikant größeres Tumolvolumen ersichtlich war als im Vergleich zu der jeweiligen Gruppe mit einer nicht-diabetischen Stoffwechsellage (Abbildung 1A und D).

Zudem fällt auf, dass die jeweiligen Gruppen, welche mit 4-MU behandelt worden, ein geringeres Tumorstadium im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen zeigten. Dies ist sowohl unter einer diabetischen als auch unter einer nicht-diabetischen Stoffwechsellage ersichtlich. Es fällt allerdings auf, dass dieser Effekt unter einer diabetischen Stoffwechsellage signifikant größer ist als unter einer nicht-diabetischen Stoffwechsellage (Abbildung 1B, C und D).

Sieht man sich die Überlebenskurven der unbehandelten sowie der mit 4-MU behandelten diabetischen Gruppen an, zeigte sich eine deutlich höhere Überlebensrate nach 90 Tagen bei der mit 4-MU behandelten Gruppe (Abbildung 2).

3.2 Morphologische Veränderungen

Um die Zellmorphologie der einzelnen Tumoren genauer zu beurteilen, erfolgte eine Hämalaun-Eosin-Färbung. Zur Übersicht der Tumoren wurden Aufnahme in geringer Vergrößerung durchgeführt, für eine Detailbeurteilung erfolgten zusätzlich Aufnahmen in einer höheren Vergrößerung.

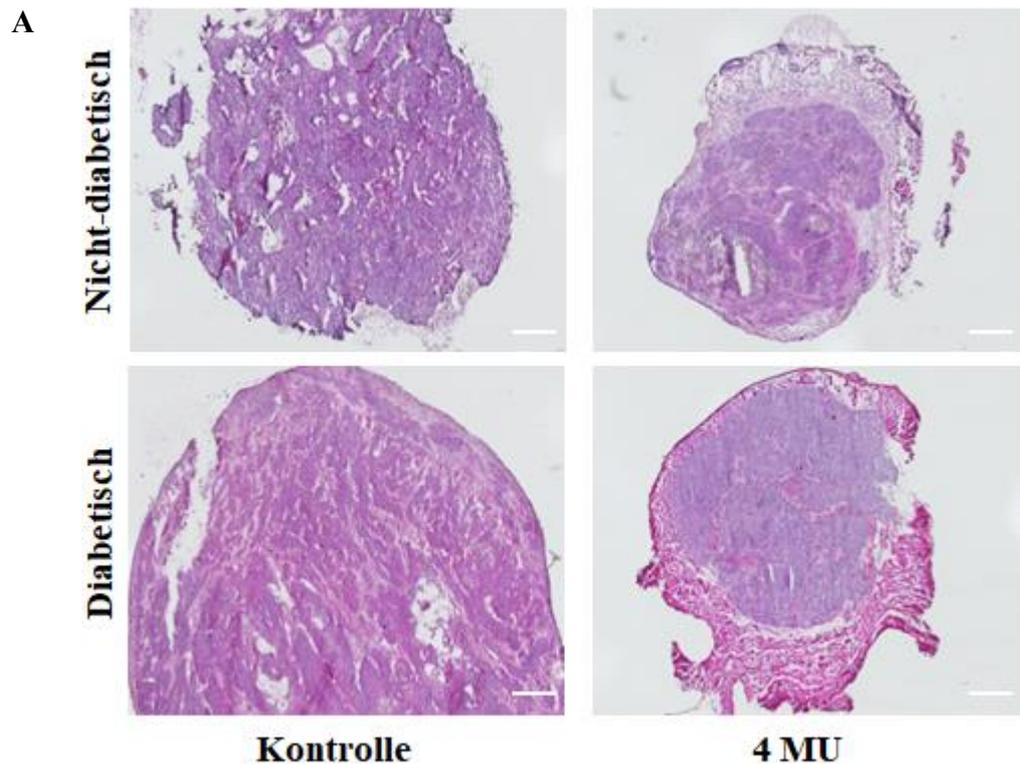


Abbildung 3: Übersichtsaufnahme in der Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zur Beurteilung von morphologischen Veränderungen der Tumorzellen und des Tumorzellstromas

In den Übersichtsaufnahmen zeigten sich bereits morphologische Veränderungen in den einzelnen Gruppen. Die Tumore, welche mit 4-Methylumbelliferon (4-MU) behandelt wurden, waren insgesamt kleiner als die ohne Behandlung. Zudem fiel unter der Behandlung mit 4-MU eine Abnahme des Stromas auf.

Bindegewebige Strukturen sowie basische Strukturen: Eosinophil, Zellkerne und saure Gewebestrukturen: basophil, Maßstabballen 500 μ m

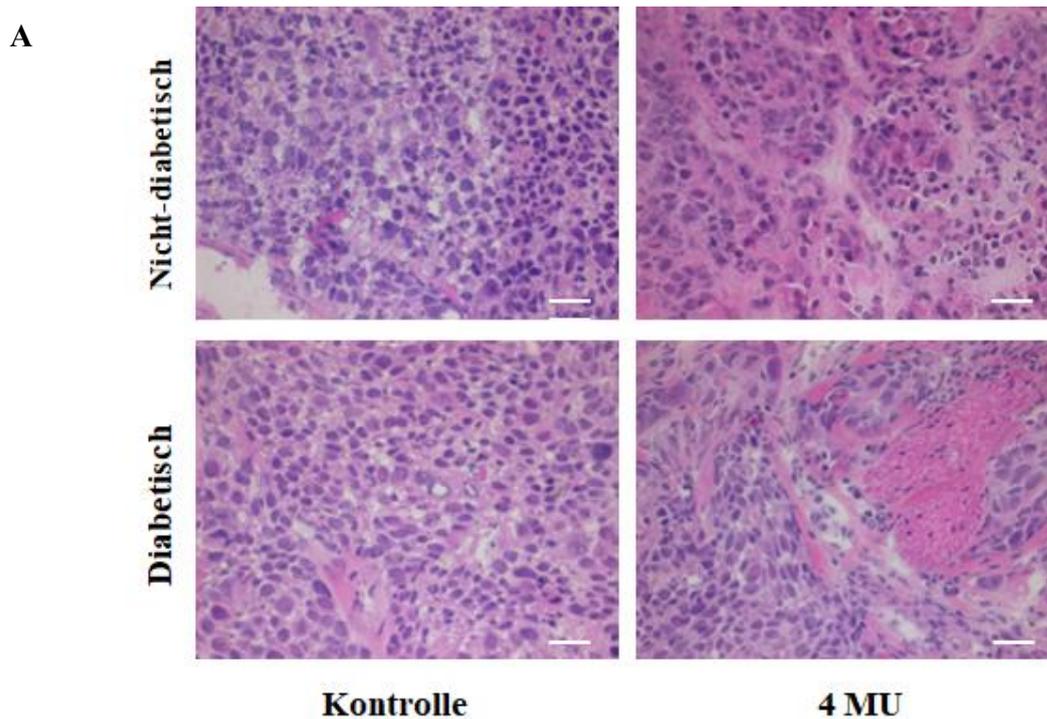


Abbildung 4: Detailaufnahme in der Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zur Beurteilung von morphologischen Veränderungen der Tumorzellen und des Tumorzellstromas

In den Detailaufnahmen waren die Zellen unter 4-MU in *cluster*-artigen Verbänden angeordnet. Es fielen bindegewebige Stränge auf.

Bindegewebige Strukturen sowie basische Strukturen: Eosinophil, Zellkerne und saure Gewebestrukturen: basophil, Maßstabalken 100 μ m

In den Übersichtsaufnahmen fiel auf, dass die Tumore, welche mit 4-MU behandelten wurden sowohl in der diabetischen als auch in der nicht-diabetischen Gruppe deutlich kleiner waren als in den jeweiligen unbehandelten Gruppen. Der Stromaanteil war insgesamt geringer als der bei den nicht behandelten Gruppen, zusätzlich waren die Tumore von bindegewebigen Septen umgeben (Abbildung 3).

In den Detailaufnahmen zeigten sich bei allen vier Gruppen typische morphologische Veränderungen der Tumorzellen, wie zum Beispiel eine Zell-und-Zellkernpolymorphie und eine Verschiebung des Zellkern-Plasma-Verhältnisses zu Gunsten der Zellkerne. Allerdings zeigten sich auch morphologische Veränderungen zwischen den einzelnen Gruppen.

In den mit 4-MU behandelten Gruppen zeigten sich eher *cluster*-artige Zellverbände, während in den jeweils unbehandelten Gruppen die Zellen in engen Verbänden zusammengelagert waren. Zusätzlich waren die Zellen in den jeweiligen mit 4-MU behandelten Gruppen von bindegewebigen Strängen umgeben und wirkten kleiner.

Zudem fiel in der unbehandelten diabetischen Gruppe eine Lockerung des Bindegewebes im Vergleich zu der unbehandelten nicht-diabetischen Gruppe auf (Abbildung 4).

3.3 Auswirkungen einer diabetischen Stoffwechsellage und von 4-Methylumbelliferon auf den Hyaluronsäuregehalt des Tumor- und Stromagewebes

Durch die Hyaluronsäure-Zytokeratin18-Färbung wurde der Einfluss von einer diabetischen Stoffwechsellage sowie von 4-MU auf den Hyaluronsäuregehalt des Tumor- und Stromagewebes untersucht.

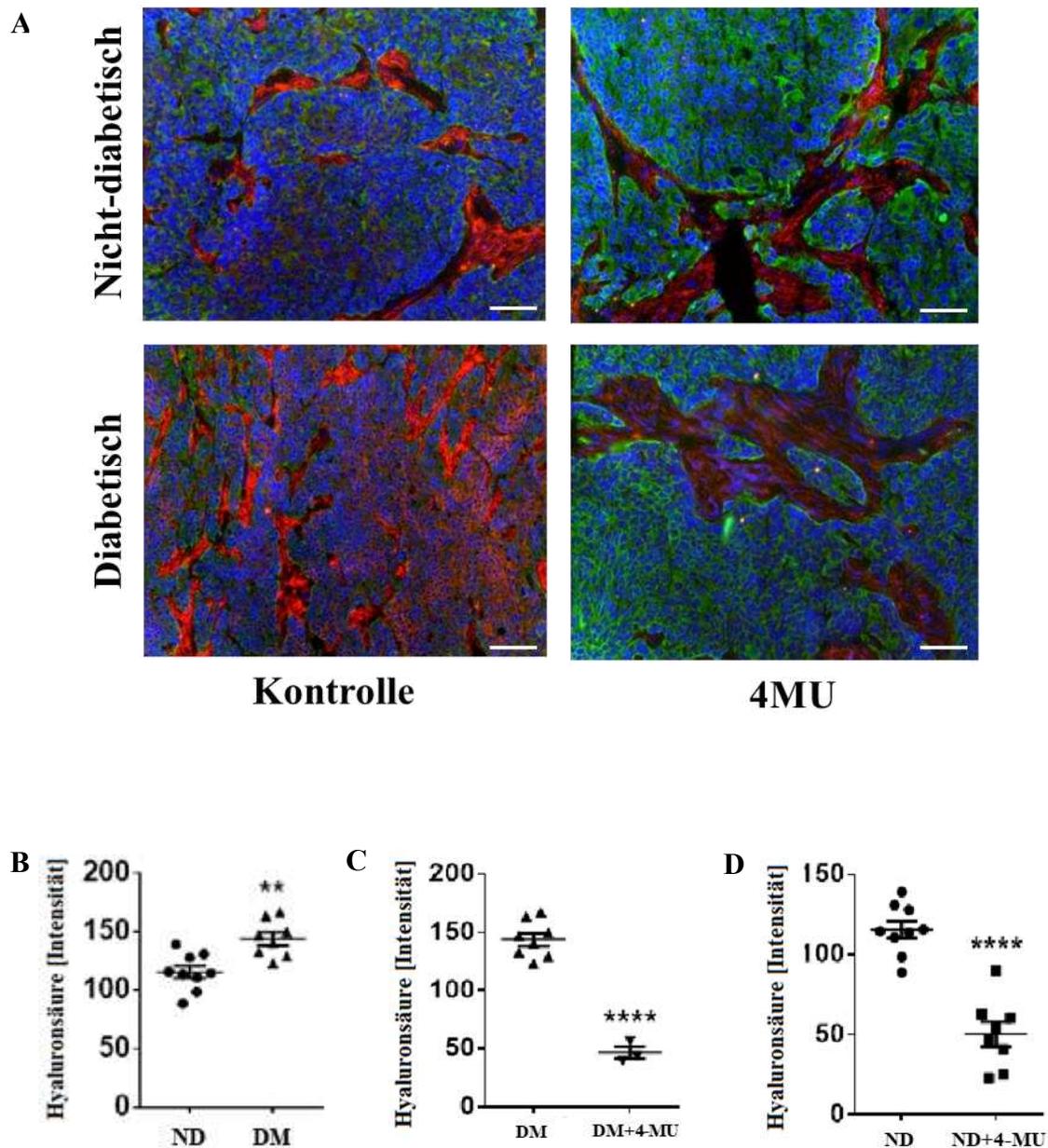


Abbildung 5: Hyaluronsäuregehalt unter diabetischer und nicht diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Behandlung mit 4-MU

A Bereits in der mikroskopischen Übersicht fielen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf. In der unbehandelten diabetischen Gruppe zeigte sich der höchste Gehalt an Hyaluronsäure (. Außerdem zeigten die jeweils mit 4-Methylumbelliferon (4-MU) behandelten Gruppen eine geringere Signalstärke.

Blau: Zellkern, Rot: Hyaluronsäure (HA), Grün: Tumorzellen (CK18), Maßstabsbalken: 100µm

B Unter einer diabetischen Stoffwechsellaage (DM) zeigte sich ein signifikant höherer Hyaluronsäuregehalt als bei der unbehandelten nicht-diabetischen Gruppe (ND). *Tumore aus diabetischen Tieren n=8, Tumore aus nicht-diabetischen Tieren n=9. Mittelwert ± SEM, **p<0.01*

C Es zeigte sich in der mit 4-MU behandelten diabetischen Gruppe (DM+4-MU) ein signifikant geringerer Hyaluronsäuregehalt als in der unbehandelten Gruppe (DM). *Tumore aus diabetischen Tieren n=8, Tumore aus diabetischen Tieren+4MU n=6. Mittelwert ± SEM, ****p<0.0001*

D Im Vergleich zu der unbehandelten nicht-diabetischen Gruppe (ND) zeigte sich bei der mit 4-MU behandelten Gruppe (ND+4-MU) ein signifikant geringerer Hyaluronsäuregehalt. *Tumore aus nicht-diabetischen Tieren n=9, Tumore aus nicht-diabetischen Tieren+4MU n=8. Mittelwert ± SEM, ****p<0.0001*

Vergleicht man die verschiedenen Gruppen untereinander, fällt auf, dass eine diabetische Stoffwechsellaage zu einem signifikant höheren Hyaluronsäuregehalt führt als eine nicht-diabetische Stoffwechsellaage (Abbildung 5A und B).

Ebenso zeigt sich, dass unter einer Behandlung mit 4-MU der Hyaluronsäuregehalt in den jeweiligen Gruppen signifikant geringer ist als in den unbehandelten Gruppen (Abbildung 5C und D).

3.4 Vaskularisierung unter einer diabetischen Stoffwechsellaage und 4-Methylumbelliferon

Um die Angiogenese der einzelnen Gruppen zu untersuchen, wurde eine CD31-Färbung durchgeführt und ausgewertet.

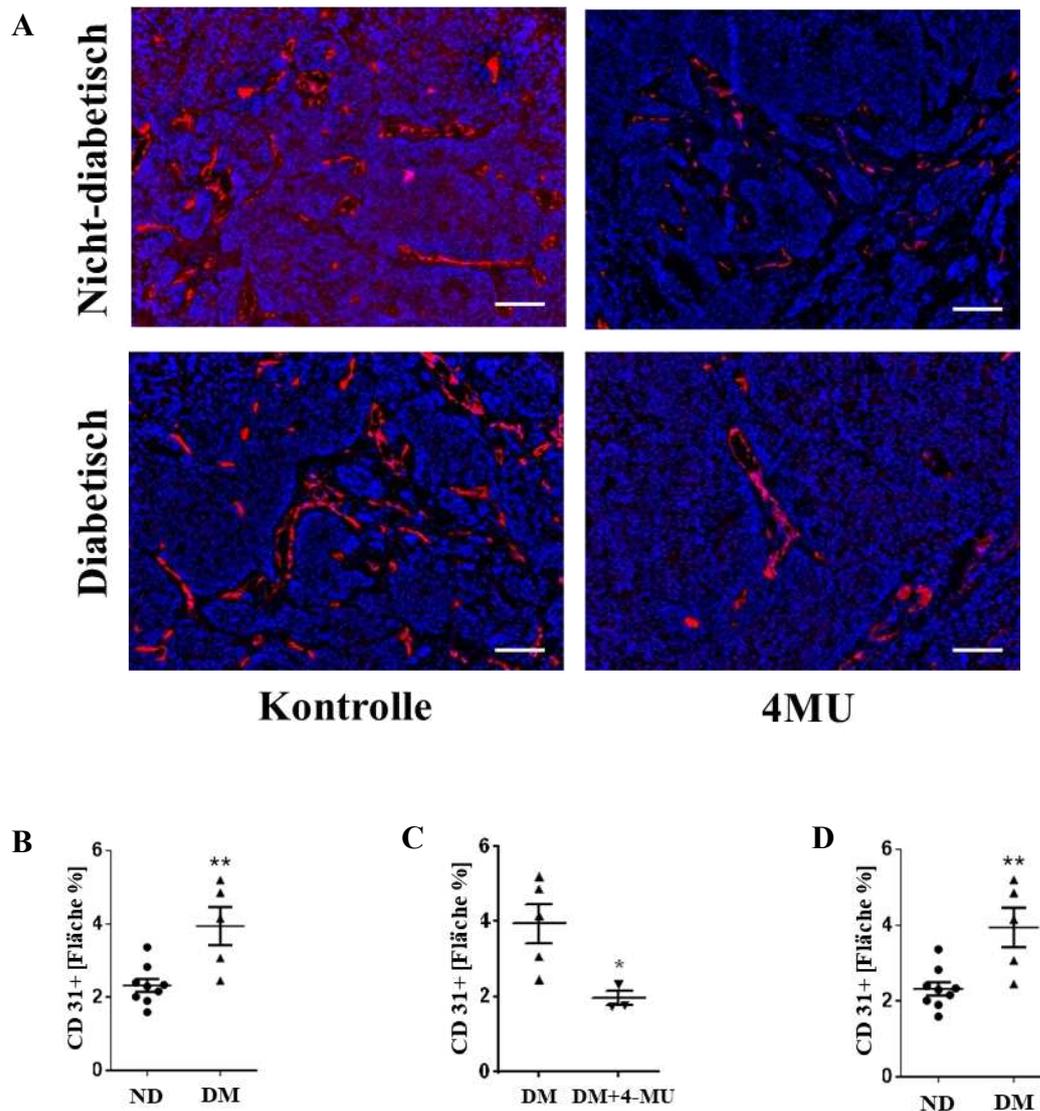


Abbildung 6: Vaskularisierung unter diabetischer und nicht diabetischer Stoffwechsellaage mit und ohne Behandlung mit 4-MU

A Auch bei der CD31-Färbung fiel bereits mikroskopisch eine erhöhte Signalanreicherung in der unbehandelten diabetischen Gruppe auf. Bei den 4-Methylumbelliferon (4-MU) behandelten Gruppen zeigten sich geringere CD31 positive Flächen als in den jeweiligen Vergleichsgruppen.

Blau: Zellkerne, Rot: CD31-positive Zellkerne, Maßstabsbalken: 100 μm

B Bei der Untersuchung der diabetischen Gruppe (DM) zeigte sich eine höhere Signifikanz an CD31-positiven Flächen als in der nicht-diabetischen Gruppe (ND). Tumore aus diabetischen Tieren $n=8$, Tumore aus nicht-diabetischen Tieren $n=9$. Auswertung mit Fiji: Markierung der CD31 positive Strukturen mittels

*Autothreshold nach Li, Mittelwert \pm SEM, $**p < 0.01$*

C Wie schon mikroskopisch gesehen, zeigte sich auch graphisch eine signifikant geringere CD31-positive Fläche in der behandelten diabetischen Gruppe (DM+4-MU) als in der unbehandelten Gruppe (DM). *Tumore aus diabetischen Tieren n=8, Tumore aus diabetischen Tieren+4MU n=6. Auswertung mit Fiji: Markierung der CD31 positive Strukturen mittels Autothreshold nach Li, Mittelwert \pm SEM, n=9-22, $*p < 0.05$*

D Im Vergleich mit der unbehandelten nicht-diabetischen Gruppe (ND) sah man bei der behandelten Gruppe (ND+4-MU) eine signifikant geringere CD31-positive Fläche. *Tumore aus nicht-diabetischen Tieren n=9, Tumore aus nicht-diabetischen Tieren+4MU n=8. Auswertung mit Fiji: Markierung der CD31 positive Strukturen mittels Autothreshold nach Li, Mittelwert \pm SEM, n=9-22, $*p < 0.05$*

Bei der Sichtung der Ergebnisse zeigte sich eine erhöhte Vaskularisierung der Tumore unter einer diabetischen Stoffwechsellage im Vergleich zu nicht-diabetischen Mäusen (Abbildung 6A und B).

Zudem war eine signifikante Abnahme der Vaskularisierung unter der 4-MU-Therapie sichtbar. Dieser Effekt zeigte sich vor allem unter der diabetischen Stoffwechsellage (Abbildung 6C und D).

3.5 Einfluss von Diabetes und 4-Methylumbelliferon auf die Proliferationsrate

Durch die Ki67-Färbung wurde die Proliferationsrate in den einzelnen Gruppen untersucht und miteinander verglichen.

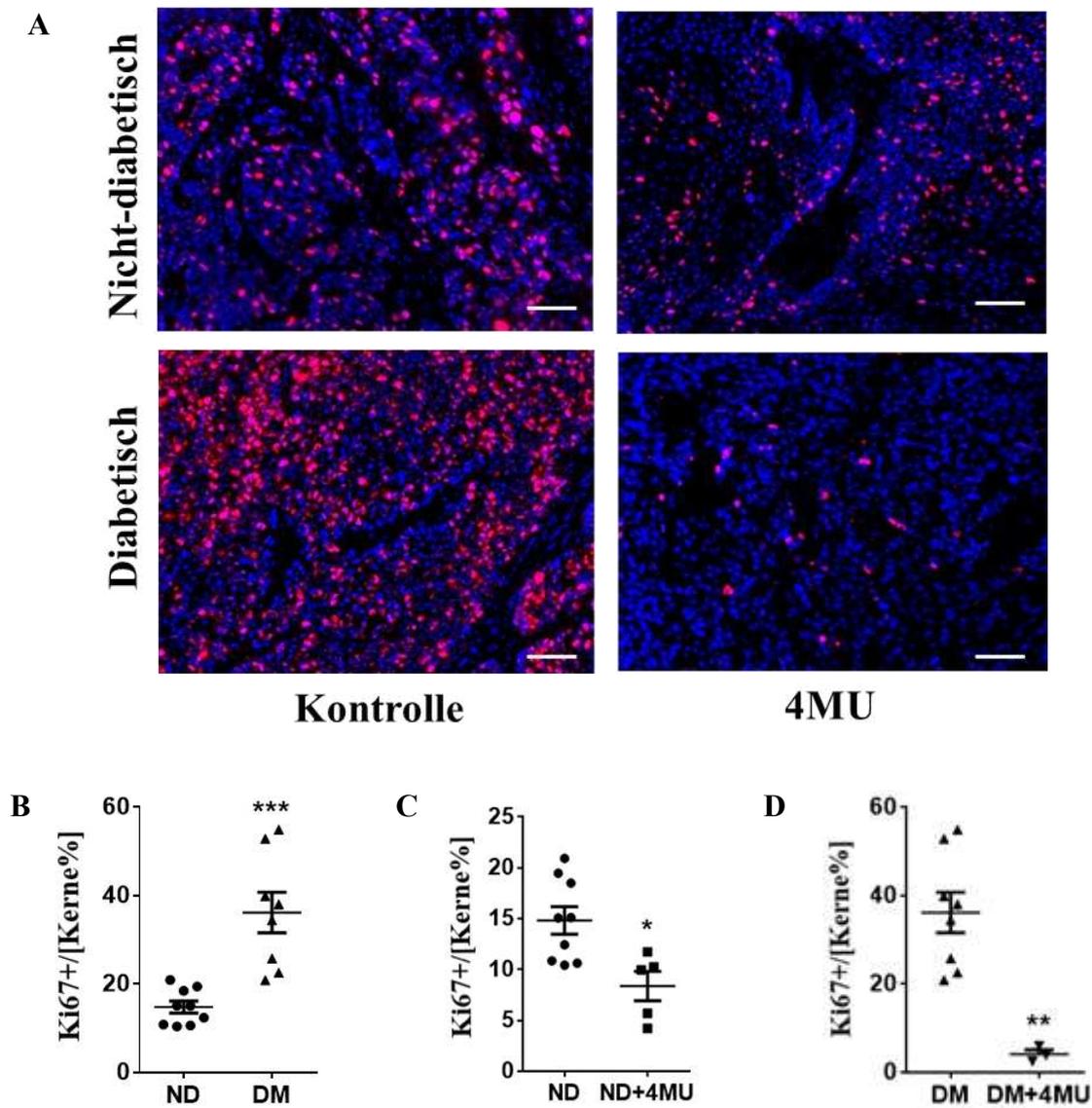


Abbildung 7: Proliferationsrate unter diabetischer und nicht diabetischer Stoffwechsellaage mit und ohne Behandlung mit 4-MU

A Bei der Auswertung der Bilder zeigte sich eine deutliche erhöhte Proliferationsrate in der diabetischen Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen, vor allem zu den mit 4-Methylumbelliferon (4-MU) behandelten Gruppen.

Blau: Zellkerne, Rot: Ki67-positive Zellkerne, Maßstabsbalken: 100 μ m

B Bei den Mäusen mit Diabetes (DM) sah man eine signifikant höhere Anzahl an Ki67 positiven Kernen als bei den nicht-diabetischen Mäusen (ND) Tumore aus diabetischen Tieren $n=8$, Tumore aus nicht-diabetischen Tieren $n=9$. Mittelwert \pm SEM, *** $p < 0.001$

C Bei den mit 4-MU behandelten, nicht-diabetischen Mäusen (ND+4-MU) zeigte sich eine signifikant geringere Anzahl an Ki67-positiven Kernen als in der unbehandelten Gruppe (ND). *Tumore aus nicht-diabetischen Tieren n=9, Tumore aus nicht-diabetischen Tieren+4MU n=8. Mittelwert \pm SEM, $**p < 0.01$,*
D Die diabetischen Mäuse, die mit 4-MU (DM+4-MU) behandelt worden, zeigten eine signifikant geringere Proliferationsrate als die unbehandelten diabetischen Mäusen (DM). *Tumore aus diabetischen Tieren n=8, Tumore aus diabetischen Tieren+4MU n=6. Mittelwert \pm SEM, $*p < 0.05$*

Unter einer diabetischen Stoffwechsellage zeigte sich eine signifikant höhere Proliferationsrate innerhalb der Tumore als im Vergleich zu der nicht diabetischen Stoffwechsellage (Abbildung 7A und B).

Zusätzlich zeigte sich eine eingeschränkte Proliferationsrate bei den mit 4-MU behandelten Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten Gruppen. Auch hier zeigte sich die Wirkung von 4-MU vor allem unter der diabetischen Stoffwechsellage signifikant stärker als in der unbehandelten Gruppe (Abbildung 7C und D).

3.6 Einfluss von Diabetes und 4-Methylumbelliferon auf die Apoptose

Zur Beurteilung der Apoptoserate der Tumorzellen wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt.

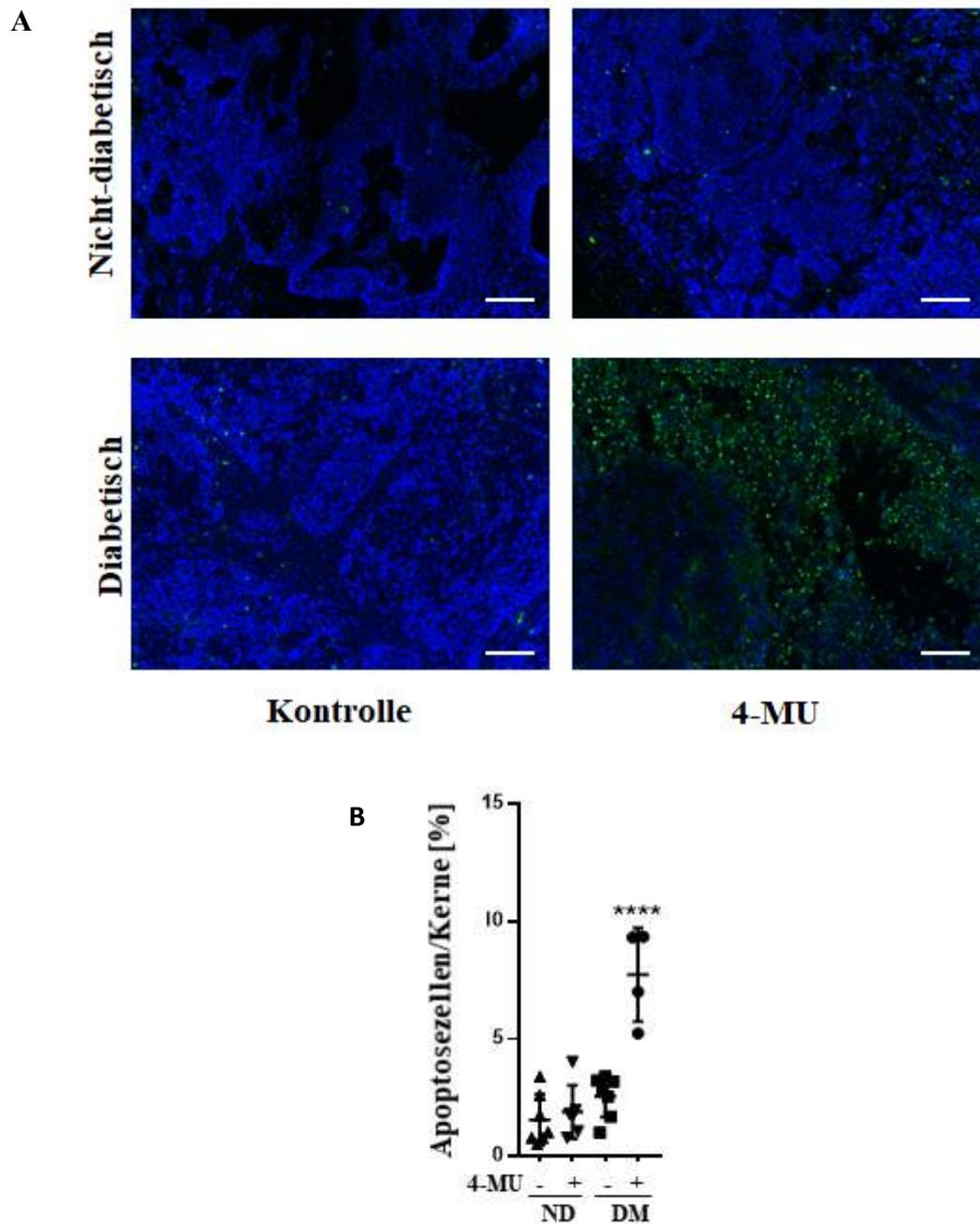


Abbildung 8: Apoptoserate unter diabetischer und nicht diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Behandlung mit 4-MU

A Mikroskopisch zeigten sich kaum apoptotische Zellen bei den nicht behandelten Gruppen. Allerdings waren deutlich mehr apoptotische Zellen in der mit 4-Methylumbelliferon (4-MU) behandelten diabetischen Gruppe ersichtlich.

Blau: Zellkerne, Grün: apoptotische Zellkerne, Maßstabsbalken: 100 μ m

B Zwischen einer diabetischen (DM) und einer nicht-diabetischen (ND) Stoffwechsellage kam es kaum zu einer nennenswerten Erhöhung der Apoptoserate. Im Vergleich zu den unbehandelten Gruppen fiel allerdings eine signifikant höhere Apoptoserate bei der mit 4-MU behandelten diabetischen Gruppe (DM+4-MU) auf. *Tumore aus diabetischen Tieren n=8, Tumore aus diabetischen Tieren+4MU=6, Tumore aus nicht-diabetischen Tieren n=9, Tumore aus nicht-diabetischen Tieren+4MU n=8. Mittelwert \pm SEM, **** $p < 0.0001$*

Im direkten Vergleich fiel auf, dass eine reine diabetische Stoffwechsellage keinen signifikanten Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur nicht-diabetischen Gruppe hervorruft (Abbildung 8A und B).

Jedoch zeigte sich deutlich, dass bei einer diabetischen Stoffwechsellage eine signifikant höhere Apoptoserate durch eine Behandlung mit 4-MU erreicht wird. Bei der nicht-diabetischen Gruppe zeigte sich dieser Effekt unter der 4-MU-Therapie nicht (Abbildung 8A und B).

4 Diskussion

Da es sich bei DM sowie Krebs um zwei jeweils weit verbreitete Krankheiten handelt, ist es wichtig, mögliche Zusammenhänge zwischen den beiden Erkrankungen aufzudecken, da dadurch neue Ansätze zur Prävention sowie Therapie gefunden werden könnten[7]. Viele Arbeiten beschäftigen sich mit den anabolen und mitogenen Wirkungen von Insulin auf Tumorzellen[24]. In dieser Arbeit wird durch die Nutzung eines pankreopriven Mausmodells der von Insulin unabhängige metabolische Einfluss der Hyperglykämie auf die HA sowie deren bekannten tumorprogressionsfördernden Eigenschaften untersucht[57]. Bereits *in vitro* Vorversuche zeigten, dass es unter einer hyperglykämischen Stoffwechsellage zu einer Steigerung der Hyaluronsäure-Synthese kommt[58]. Damit assoziiert wird in dieser Arbeit auch eine Steigerung der tumorprogressionsfördernden Eigenschaften der Hyaluronsäure nachgewiesen.

Zudem wird die Wirkung von 4-MU auf die einzelnen tumorfördernden Eigenschaften der Hyaluronsäure untersucht. Da es sich bei 4-MU um eine oral verfügbare sowie gut verträgliche Substanz handelt, wäre hierdurch eine vielversprechende Therapieoption gegeben. In dieser Arbeit zeigt sich, dass durch 4-MU weniger Hyaluronsäure produziert wird und sich dadurch auch die tumorprogressionsfördernden Eigenschaften weniger signifikant darstellen.

Im Weiteren werden die einzelnen Aspekte der Untersuchungen erläutert.

4.1 Auswirkungen von Hyperglykämien auf das Tumorwachstum

Wie die Ergebnisse in Kapitel 3.1. zeigen, kommt es im Rahmen einer diabetischen Stoffwechsellage und der damit verbundenen Hyperglykämie zu einem stärkeren Tumorwachstum als bei einer nicht-diabetischen Stoffwechsellage. Dies lässt sich zum einen dadurch erklären, dass der Tumorzelle vermehrt Glukose zur Verfügung steht, die sie unter anderem für die ATP-Bildung nutzen kann und dadurch mehr Energie zum Wachstum vorhanden ist. Zum anderen lässt sich vermuten, dass es durch die Hyperglykämie auch zu einer vermehrten Hyaluronsäuresynthese kommt, da diese aus Glukosederivaten gebildet wird[59]. Es ist bekannt, dass HA tumorprogressionsfördernde Eigenschaften aufweist[60] und somit auch das Tumorwachstum positiv beeinflusst. Die Hypothese der erhöhten Synthese

und des damit verbundenen Tumorwachstums lässt sich auch dadurch bestärken, dass es unter der Behandlung mit dem Hyaluronsäuresynthase-Inhibitor 4-MU jeweils zu einem geringeren Tumorwachstum kam als in der unbehandelten Gruppe. 4-MU führt zu einer geringeren Hyaluronsäuresynthese, wodurch die tumorprogressionsfördernden Einflüsse der HA auf die Tumorzelle geringer sind. Wie die Ergebnisse in Kapitel 3.1 zeigen, ist der hemmende Effekt von 4-MU auf das Tumorwachstum vor allem unter der diabetischen Stoffwechsellage verstärkt.

Zusätzlich fällt auf, dass das Tumorwachstum unter einer diabetischen Stoffwechsellage zwar nach 90 Tagen insgesamt erhöht war, es aber erst verspätet zu einem signifikant höheren Tumorwachstum kam als unter einer nicht-diabetischen Stoffwechsellage. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass erst in späteren Stadien des Tumorwachstums die Glukoseversorgung eine große Rolle spielt.

Zudem zeigen die Ergebnisse in Kapitel 3.1 eine längere Überlebenszeit von mit 4-MU behandelten diabetischen Mäusen gegenüber unbehandelten diabetischen Mäusen. Eine mögliche Ursache könnte die geringere HA-Synthese und damit verbundene geringere Tumorlast unter der 4-MU-Behandlung sein.

4.2 Auswirkungen von einer diabetischen Stoffwechsellage sowie 4-Methylumbelliferon auf den Hyaluronsäuregehalt

Bereits in früheren Studien wurden Hinweise darauf gefunden, dass unter einer erhöhten Glukosekonzentration eine verstärkte HA-Synthese stattfindet. Unter anderem wurden bei Patienten mit Typ I[32] und Typ II[61] DM erhöhte HA-Spiegel im Blut gemessen.

Um die Vermutung zu beweisen, dass es durch Hyperglykämien zu einer vermehrten Hyaluronsäuresynthese kommt, wurde eine Hyaluronsäure-Zytokeratin18-Doppelfärbung durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass der Hyaluronsäuregehalt bei den Tieren mit einer diabetischen Stoffwechsellage signifikant höher ist als bei der nicht-diabetischen Gruppe. Dadurch lässt sich bestätigen, dass eine Hyperglykämie einen fördernden Einfluss auf die Hyaluronsäuresynthese hat. Durch das vermehrte Glukoseangebot kommt es nicht nur zur verstärkten Nutzung des Pentosephosphatweges, sondern auch zu einer erhöhten Aktivierung der Glykolyse, die in Tumorzellen als einer der wichtigsten Mechanismen der Energiegewinnung gilt. Es ist bekannt, dass in vielen Tumorzellen auch ohne erhöhtes Glukoseangebot bereits eine höhere Glykolyse-Rate vorhanden ist als in physiologischen

Zellen[20]. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass eine insgesamt gesteigerte Glykolyse eher zu einer Abnahme der HA-Synthese führt, da die vorhandenen Glukosemetaboliten dort vermehrt verbraucht werden und daher nicht zur HA-Synthese zur Verfügung stehen[51]. In der Literatur gibt es allerdings auch Hinweise darauf, dass es bei einer Insulinresistenz, wie sie z.B. bei einem DM vorliegt, durch die verminderte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweg zu einer geringeren Glykolyse kommt, während die wachstumsfördernden Eigenschaften von Insulin über den IGF-Rezeptor/Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Weg bestehen bleiben[62, 63] Hierdurch ist anzunehmen, dass die vorhandenen Glukose-Metaboliten nun unter anderem vermehrt für die HA-Synthese zur Verfügung stehen und es dadurch zu einem erhöhten HA-Gehalt in den Tumorzellen kommt.

Bei der Färbung zeigt sich außerdem wie erwartet ein niedrigerer Hyaluronsäuregehalt in den jeweils mit 4-MU behandelten Gruppen, da dieses die Hyaluronsäuresynthese hemmt[44]. Interessant ist vor allem, dass es auch in der mit 4-MU behandelten diabetischen Gruppe zu einem signifikant geringeren Hyaluronsäuregehalt kam als in der unbehandelten diabetischen Gruppe. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Inhibition der HA-Synthese durch 4-MU stärker ausfällt als die Steigerung der HA-Synthese durch das erhöhte Glucose-Angebot im Rahmen einer hyperglykämischen Stoffwechsellaage.

4.3 Einfluss der erhöhten Hyaluronsäuresynthese unter diabetischer Stoffwechsellaage auf die Vaskularisierung

Wie oben beschrieben, kommt es unter einer diabetischen Stoffwechsellaage zu einer erhöhten Hyaluronsäuresynthese. Nun stellt sich die Frage, inwieweit auch die tumorprogressionsfördernden Eigenschaften der HA verstärkt in den Tumoren zu sehen sind. Für die Beurteilung der Neoangiogenese wurde eine CD31 Färbung durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass es bei den Tumoren der jeweiligen 4-MU Gruppen, welche einen geringeren Hyaluronsäuregehalt haben als die unbehandelten, auch zu einer geringeren Vaskularisierung kommt, wo hingegen die Tumore mit viel HA auch eine verstärkte Vaskularisierung aufzeigen. Dies lässt sich so erklären, dass es durch das vermehrte Vorkommen der HA zu einer erhöhten Aktivierung von Hyaluronsäurerezeptoren wie CD44 kommt. Dies führt zur Aktivierung verschiedener Kaskaden, wie zum Beispiel dem PI3K/AKT-Signalweg[64], der die Angiogenese fördern kann. Folglich kommt es dadurch in hyaluronsäurereichen Tumoren zu einer erhöhten Freisetzung von neoangiogenetischen Signalen und damit auch zu einer verstärkten Vaskularisierung. Durch die Hemmung der

Hyaluronsäuresynthese durch 4-MU verringern sich diese neoangiogenetischen Signale und somit auch, wie oben beschrieben, die Vaskularisierung.

4.4 Einfluss einer erhöhten Hyaluronsäuresynthese unter diabetischer Stoffwechsellaage auf die Proliferation von Tumorzellen

Wie die Ergebnisse in Kapitel 3.5 zeigen, kommt es unter einer diabetischen Stoffwechsellaage zu einer erhöhten Proliferationsrate der Tumorzellen. Ebenso sieht man, dass die Behandlung mit 4-MU sowohl unter einer physiologischen als einer diabetischen Stoffwechsellaage zu einer signifikanten Verringerung der Proliferation in den Tumoren führt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass es unter der diabetischen Stoffwechsellaage zu einer erhöhten Hyaluronsäuresynthese kommt. Durch die Bindung von HA an ihre Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM kommt es zur Aktivierung verschiedener Kaskaden, die letztendlich zu einer erhöhten Proliferation führen[37]. Durch die Behandlung mit 4-MU wird die Hyaluronsäuresynthese verringert, was als Folge hat, dass die oben beschriebene Bindung von dieser an die Hyaluronsäurerezeptoren abnimmt und somit auch die Kaskaden, welche die Proliferation beeinflussen, weniger aktiviert werden und somit die Proliferationsrate abnimmt.

4.5 Einfluss einer erhöhten Hyaluronsäuresynthese unter diabetischer Stoffwechsellaage auf die Apoptose

In vitro Vorversuche haben gezeigt, dass es unter einer hyperglykämischen Stoffwechsellaage sowie der Abwesenheit von Insulin zu *cluster*-artigen Zusammenlagerungen der Zellen kam. Erstaunlicherweise waren die Zellverbände unter Insulin aber deutlich vergrößert. Dies könnte sich unter anderem durch die mitogene Wirkung von Insulin auf die Zellverbände erklären. Zudem könnte der erhöhte HA-Gehalt bei den ohne Insulin behandelten Zellverbände eine Unterdrückung der Zell-Zell-Interaktion und somit eine Zusammenlagerung der Zellen verhindern[51].

Um nun zu untersuchen, ob die Hyaluronsäuremenge einen Einfluss auf die Apoptose der Zellen hat, wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass es bei einem hohen Hyaluronsäuregehalt zu einer signifikant geringeren Apoptose kommt als bei einem niedrigen Gehalt.

Während es bei gesunden Zellen durch den Verlust von Integrin-Signalen zur Einleitung einer Apoptose kommt, sobald diese den Zellverband verlassen, scheint es bei einem erhöhten HA-Gehalt zur Unterdrückung der Apoptose zu kommen. Es ist bekannt, dass HA einen anti-apoptotischen Einfluss auf Zellen hat. Durch die Bindung von HA an den CD44-Rezeptor werden sowohl verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie zum Beispiel EGFR und c-Met, als auch Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie Src, aktiviert. Diese wiederum setzen unter anderem die PI3K/AKT und MAPK/ERK-Wege in Gang, welche einen anti-apoptotischen Effekt haben[65]. Auf Grund dieser Mechanismen kommt es durch den erhöhten Hyaluronsäuregehalt zu einer verstärkten Freisetzung der anti-apoptotischen Signale und schließlich zu einer verringerten Apoptose. Dieser Effekt wird durch die Behandlung mit 4-MU signifikant verringert, da es darunter zu einer geringeren Bildung von HA kommt und die anti-apoptotischen Effekte verringert werden, sodass es letztendlich zu einem verstärkten Zelluntergang der Tumorzellen kommt.

4.6 Ausblick

Da es sich bei Diabetes mellitus um eine Volkskrankheit handelt und somit eine große Patientengruppe nachweislich ein erhöhtes Risiko für eine Tumorerkrankung hat[7], wäre eine Zusatztherapie bei Krebspatienten mit diabetischer Komorbidität ein wichtiger Ansatzpunkt.

Wie in dieser Arbeit *in vivo* im Mausmodell gezeigt werden konnte, kommt es durch eine hyperglykämische Stoffwechsellage, wie sie bei Patienten mit einer Diabetes-Erkrankung zu finden ist, zu einer Erhöhung des HA-Gehaltes im Tumorgewebe und in der Folge zu einer gesteigerten HA-vermittelten Tumorprogression. Die oben angegebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass der inhibierende Effekt von 4-MU auf die HA-Synthese gerade unter einer diabetischen Stoffwechsellage stärker ausgeprägt ist als bei einer nicht-diabetischen Stoffwechsellage. Auch zeigte die Behandlung mit 4-MU gerade bei den diabetischen Mäusen eine signifikant verlängerte Überlebenszeit im Vergleich zu den unbehandelten diabetischen Mäusen. Somit ist anzunehmen, dass Tumorpatienten mit einer diabetischen Komorbidität besonders von dieser Behandlung profitieren könnten.

Da das genutzte 4-MU bereits als Spasmolytikum in vielen Ländern für Menschen zugelassen ist und somit eine realistische Risiko-Nutzen-Abschätzung bekannt ist, könnten hierdurch zukünftige klinische Versuche erleichtert werden. Zudem handelt es sich bei 4-MU um ein oral verfügbares Medikament mit nur wenigen Nebenwirkungen. Somit könnte es eine sichere

und wirksame Therapieoption für diabetische Patienten mit Tumorerkrankungen darstellen. Interessant wäre zu untersuchen, ob Nebenwirkungen von 4-MU, wie zum Beispiel eine Xerodermie, bei Diabetikern ausgeprägter sind als bei Patienten ohne Diabetes, da Diabetiker bereits eine erkrankungsbedingte Xerodermie und einen damit verbundenen Pruritus aufweisen können[66].

Durch die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse wird die Grundlage für zukünftige Forschungen im Rahmen von klinischen Studien gelegt, um die Wirksamkeit von 4-MU bei diabetischen Patienten mit einer Tumorerkrankung zu bestätigen. Auch weitere *in vitro* sowie *in vivo* Versuche bei anderen Tumorentitäten, wie z.B. Bindegewebstumoren, sollten in Betracht gezogen werden, um zu zeigen, dass die oben genannten Ergebnisse auch auf andere Zelltypen als die genutzten OSC-1-Zellen zutreffen. Hinweise auf eine Wirksamkeit in anderen Tumorentitäten sind in der Literatur gut belegt, so zeigten *in vivo* Experimente an Mäusen mit Prostatakarzinom, dass es bei einer Behandlung von 4-MU zu einer Verringerung der Vaskularisierung, Proliferationsrate sowie zu einer Aufhebung der Skelettmetastasierung kommt[67].

Zudem könnten zukünftige Forschungen zu möglichen Kombinationstherapie von 4-MU mit anderen supportiven Medikamenten in der Krebsbehandlung ein interessanter Ansatz sein.

In Zusammenschau der oben angesprochenen Aspekte sowie bereits vorhandenen Arbeiten erscheinen weitere Untersuchungen und Forschungen wichtig, um Diabetiker als vulnerable Gruppe für Tumorerkrankungen besser behandeln zu können. In diesem Zusammenhang leistet diese Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der mechanistischen Zusammenhänge und beschreibt einen potentiell wirksamen Arzneistoff.

5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Experimente in dieser Arbeit zeigen einen Zusammenhang zwischen einer Hyperglykämie im Rahmen einer diabetischen Stoffwechsellage, einem erhöhten Hyaluronsäuregehalt und einer vermehrten Tumorprogression. Durch das größere Glukoseangebot kommt es zu einer gesteigerten Bildung von Glukose-Derivaten, die für die Hyaluronsäuresynthese genutzt werden können. Dadurch zeigte sich ein größerer Hyaluronsäuregehalt als unter einer physiologischen Stoffwechsellage. Durch den gesteigerten Hyaluronsäuregehalt kommt es auch zu einer Verstärkung der tumorprogressionsfördernden Eigenschaften der HA, welche sich positiv auf das Wachstum, die Vaskularisierung und die Proliferation sowie hemmend auf die Apoptoserate der Zellen auswirken. Somit ist gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Hyaluronsäuregehalt und einer verstärkten Tumorprogression gibt.

Aus diesem Grund wurde auch der Einfluss von dem Hyaluronsäuresynthase-Inhibitor 4-MU auf den Hyaluronsäuregehalt und die damit verbundenen tumorprogressions-steigernden Eigenschaften untersucht. Durch die Behandlung kommt es zu einer Senkung des Hyaluronsäuregehaltes sowohl unter physiologischer als auch diabetischer Stoffwechsellage und somit auch zu einer Verringerung der Tumorprogression.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern die Grundlage für weitere Forschungen, beispielsweise im Rahmen klinischer Studien, bezüglich diabetischer Tumor-Patienten, die eine große, besonders vulnerable und schwierig zu behandelnde Patientengruppe darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Pennathur, A., et al., *Oesophageal carcinoma*. Lancet, 2013. 381(9864): p. 400-12.
2. Szumilo, J., et al., *[Cyclooxygenase inhibitors in chemoprevention and treatment of esophageal squamous cell carcinoma]*. Pol Merkur Lekarski, 2009. 27(161): p. 408-12.
3. DKG, *Leitlinienprogramm Onkologie S3-Leitlinie Ösophaguskarzinom Kurzversion*. 2015.
4. International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*. 2015.
5. Kerner, W., Brückel, J., *Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus*. Diabetologie und Stoffwechsel, 2015. 10(S 02): p. S98-S101.
6. Papatheodorou, K., et al., *Complications of Diabetes*. J Diabetes Res, 2015. 2015: p. 189525.
7. Giovannucci, E., et al., *Diabetes and cancer: a consensus report*. CA Cancer J Clin, 2010. 60(4): p. 207-21.
8. Huxley, R., et al., *Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies*. Br J Cancer, 2005. 92(11): p. 2076-83.
9. Larsson, S.C., N. Orsini, and A. Wolk, *Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis*. J Natl Cancer Inst, 2005. 97(22): p. 1679-87.
10. Washio, M., et al., *Diabetes mellitus and kidney cancer risk: the results of Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk (JACC Study)*. Int J Urol, 2007. 14(5): p. 393-7.
11. Larsson, S.C., et al., *Diabetes mellitus and risk of bladder cancer: a meta-analysis*. Diabetologia, 2006. 49(12): p. 2819-23.
12. Larsson, S.C., C.S. Mantzoros, and A. Wolk, *Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis*. Int J Cancer, 2007. 121(4): p. 856-62.
13. Kasper, J.S. and E. Giovannucci, *A meta-analysis of diabetes mellitus and the risk of prostate cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. 15(11): p. 2056-62.
14. Feng, Y.H., et al., *Diabetes mellitus impairs the response to intra-arterial chemotherapy in hepatocellular carcinoma*. Med Oncol, 2011. 28(4): p. 1080-8.
15. Jee, S.H., et al., *Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women*. JAMA, 2005. 293(2): p. 194-202.
16. Stocks, T., et al., *Blood glucose and risk of incident and fatal cancer in the metabolic syndrome and cancer project (me-can): analysis of six prospective cohorts*. PLoS Med, 2009. 6(12): p. e1000201.
17. Vigneri, P., et al., *Diabetes and cancer*. Endocr Relat Cancer, 2009. 16(4): p. 1103-23.
18. Goalstone, M.L. and B. Draznin, *Insulin signaling*. West J Med, 1997. 167(3): p. 166-73.
19. Medina, R.A. and G.I. Owen, *Glucose transporters: expression, regulation and cancer*. Biol Res, 2002. 35(1): p. 9-26.
20. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. 123(3191): p. 309-14.
21. 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.
22. Marin-Hernandez, A., et al., *HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms*. Mini Rev Med Chem, 2009. 9(9): p. 1084-101.

23. Probst, I. and K. Unthan-Fechner, *Activation of glycolysis by insulin with a sequential increase of the 6-phosphofructo-2-kinase activity, fructose-2,6-bisphosphate level and pyruvate kinase activity in cultured rat hepatocytes*. Eur J Biochem, 1985. 153(2): p. 347-53.
24. Gallagher, E.J., et al., *The pathway from diabetes and obesity to cancer, on the route to targeted therapy*. Endocr Pract, 2010. 16(5): p. 864-73.
25. Samani, A.A., et al., *The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights*. Endocr Rev, 2007. 28(1): p. 20-47.
26. Frasca, F., et al., *The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases*. Arch Physiol Biochem, 2008. 114(1): p. 23-37.
27. Duan, W., et al., *Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression*. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 461917.
28. Ryu, T.Y., J. Park, and P.E. Scherer, *Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression*. Diabetes Metab J, 2014. 38(5): p. 330-6.
29. Kato, H., et al., *Glut-1 glucose transporter expression in esophageal squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness*. Anticancer Res, 2002. 22(5): p. 2635-9.
30. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. J Biol Chem, 1999. 274(35): p. 25085-92.
31. Chajara, A., et al., *Circulating hyaluronan and hyaluronidase are increased in diabetic rats*. Diabetologia, 2000. 43(3): p. 387-8.
32. Nieuwdorp, M., et al., *Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis*. Diabetologia, 2007. 50(6): p. 1288-93.
33. Erickson, M. and R. Stern, *Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism*. Biochem Res Int, 2012. 2012: p. 893947.
34. Fam, H., J.T. Bryant, and M. Kontopoulou, *Rheological properties of synovial fluids*. Biorheology, 2007. 44(2): p. 59-74.
35. Inkinen, R.I., et al., *Hyaluronan distribution in the human and canine intervertebral disc and cartilage endplate*. Histochem J, 1999. 31(9): p. 579-87.
36. Turley, E.A., P.W. Noble, and L.Y. Bourguignon, *Signaling properties of hyaluronan receptors*. J Biol Chem, 2002. 277(7): p. 4589-92.
37. Ghatak, S., S. Misra, and B.P. Toole, *Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway*. J Biol Chem, 2002. 277(41): p. 38013-20.
38. Tian, X., et al., *High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat*. Nature, 2013. 499(7458): p. 346-9.
39. 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.
40. Baumgartner, G., et al., *The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors--experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy*. Cancer Lett, 1998. 131(1): p. 85-99.
41. Bharadwaj, A.G., K. Rector, and M.A. Simpson, *Inducible hyaluronan production reveals differential effects on prostate tumor cell growth and tumor angiogenesis*. Journal of Biological Chemistry, 2007. 282(28): p. 20561-20572.
42. Li, Y., et al., *Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells*. Int J Cancer, 2007. 120(12): p. 2557-67.
43. Twarock, S., et al., *Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells*. J Biol Chem, 2010. 285(30): p. 23276-84.

44. 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.
45. 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.
46. Yoshihara, S., et al., *A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells*. FEBS Lett, 2005. 579(12): p. 2722-6.
47. 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.
48. Palyi-Krek, Z., et al., *Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer*. Eur J Cancer, 2007. 43(16): p. 2423-33.
49. Twarock, S., et al., *Inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma progression by in vivo targeting of hyaluronan synthesis*. Mol Cancer, 2011. 10: p. 30.
50. Dolorgiet, *Fachinformation Cholspasmin(R) forte*. 2014.
51. Twarock, S., et al., *Hyperglycaemia and aberrated insulin signalling stimulate tumour progression via induction of the extracellular matrix component hyaluronan*. Int J Cancer, 2017. 141(4): p. 791-804.
52. life technologies, *Click-iT® Plus TUNEL Assay* 2014.
53. Graham, M.L., et al., *The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources*. Comp Med, 2011. 61(4): p. 356-60.
54. Ssniff, *Katalog Futtermittel Mäuse und Ratten*. 2005.
55. 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.
56. Euhus, D.M., et al., *Tumor measurement in the nude mouse*. J Surg Oncol, 1986. 31(4): p. 229-34.
57. Itano, N., L. Zhuo, and K. Kimata, *Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression*. Cancer Sci, 2008. 99(9): p. 1720-5.
58. Shakya, S., et al., *Hyperglycemia-Induced Changes in Hyaluronan Contribute to Impaired Skin Wound Healing in Diabetes: Review and Perspective*. Int J Cell Biol, 2015. 2015: p. 701738.
59. Pires, A.M. and M.H. Santana, *Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid*. Appl Biochem Biotechnol, 2010. 162(6): p. 1751-61.
60. Sironen, R.K., et al., *Hyaluronan in human malignancies*. Exp Cell Res, 2011. 317(4): p. 383-91.
61. Dasu, M.R., et al., *Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects*. Diabetes Care, 2010. 33(4): p. 861-8.
62. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox*. Cell Metab, 2008. 7(2): p. 95-6.
63. Cusi, K., et al., *Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle*. Journal of Clinical Investigation, 2000. 105(3): p. 311-320.
64. Karar, J. and A. Maity, *PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis*. Front Mol Neurosci, 2011. 4: p. 51.
65. Misra, S., et al., *Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer*. Frontiers in Immunology, 2015. 6(201).

-
66. Lima, A.L., et al., *Cutaneous Manifestations of Diabetes Mellitus: A Review*. Am J Clin Dermatol, 2017. 18(4): p. 541-553.
 67. 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 beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock für die ausgezeichnete Betreuung sowie die enorme Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung sowie den Zugang zu den Materialien muss ich dem Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, insbesondere dem Direktor Herr 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, meinen Geschwistern, meinem Partner sowie meiner lieben Freundin Kathy danke ich für ihre Geduld und Ermutigungen während der Arbeit an dieser Doktorarbeit.