

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

Hyaluronsäure als Bindeglied zwischen Diabetes und Tumorprogression

Dissertation

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

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Sören Twarock

2017

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

gez.:

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

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

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Timm J. Filler

Quidquid agis, prudenter agas et respice finem

Βουλεύου δὲ πρὸ ἔργου, ὅπως μὴ μῶρα πέληται

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

Zusammenfassung

Epidemiologische Untersuchungen haben eine erhöhte Inzidenz verschiedener Tumorerkrankungen wie Leber-, Pankreas-, Endometrium-, Kolorektal-, Ösophagus-, Mamma- und Blasenkarzinom bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern identifiziert. Das Extrazellulärmatrix-Molekül Hyaluronsäure ist ein unverzweigtes Polysaccharid, das aus Glukose-Vorstufen gebildet wird und die Tumorprogression über die Förderung von Proliferation, Invasion, adhäsionsunabhängigem Wachstum und Chemotherapie-Resistenz unterstützen kann.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Relevanz des Hyaluronsäure-Systems als Mediator der Tumorprogression unter diabetischen Bedingungen zu untersuchen. Dazu wurde der Einfluss einer erhöhten Glukose-Konzentration in Verbindung mit einer gestörten Insulin-Wirkung auf die Synthese der Hyaluronsäure untersucht. Zur genaueren Charakterisierung des zugrundeliegenden Mechanismus wurde ebenfalls die Aktivität von Glukose-verbrauchenden Stoffwechselwegen, wie Glykolyse und Pentosephosphatweg, in die Betrachtung miteinbezogen. In funktionellen Experimenten wurden schließlich die Auswirkungen der gesteigerten Hyaluronsäure-Synthese unter diabetischen Bedingungen auf die Proliferation, die Invasion, das adhäsionsunabhängige Wachstum und die Adhäsion an Endothelzellen analysiert.

Diese Arbeit zeigt, dass eine Hyperglykämie in Verbindung mit einer gestörten Insulinwirkung, wie sie durch einen absoluten Insulin-Mangel beim Typ-1-Diabetes bzw. durch eine Insulinresistenz beim Typ-2-Diabetes zustande kommt, zu einer Verringerung der Glykolyse führt. Die dadurch verstärkt anfallenden Glukose-Metaboliten der frühen Glykolyse, wie z.B. Glukose-6-Phosphat, stehen in der Folge als Substrate für eine gesteigerte Hyaluronsäure-Synthese zur Verfügung. Dieser Mechanismus führt schließlich zu einer Förderung der Tumorprogression.

Somit stellt die unter diabetischen Bedingungen auftretende metabolische Umschaltung von Glukose-Katabolismus zu Hyaluronsäure-Anabolismus eine wichtige Verknüpfung zwischen Diabetes und Tumorprogression dar und bietet auf diese Weise eine Erklärung für die erhöhte Inzidenz von diversen Tumorentitäten bei diabetischen Patienten. Diese Erkenntnisse könnten in zukünftigen Untersuchung zur Etablierung einer zielgerichteten pharmakologischen Therapie für diabetische Tumorkranke führen.

Summary

Epidemiologic studies have identified an elevated incidence of certain tumor entities e.g. liver, pancreas, endometrium, colon, rectum, esophagus, breast, and bladder cancer in diabetes type 1 and type 2 patients. Hyaluronan is an unbranched polysaccharide, which is formed from glucose-derived precursors, that plays an important role in tumor development by supporting proliferation, invasion, anchorage-independent growth and chemotherapy resistance.

The aim of this work was to elucidate the relevance of the hyaluronan system as a mediator of tumor progression under diabetic conditions. Therefore, the effects of hyperglycemia as well as perturbed insulin effects on the synthesis of HA were examined. Furthermore, the influence of glucose consuming pathways, i.e. glycolysis and pentose phosphate pathway, on the HA synthesis were evaluated. Finally, the impact of the elevated HA synthesis under diabetic conditions on important tumor characteristics such as proliferation, invasion, anchorage-independent growth and endothelial adhesion was assessed to prove a functional relevance of this mechanism.

The work presented here shows that decreased insulin effects, which occur due to insulin deficiency in diabetes type 1 or insulin resistance in diabetes type 2, in connection with hyperglycemia diminish glycolysis and thus lead to the use of early glucose metabolites such as glucose-6-phosphate for HA production instead of energy gain. This mechanism eventually supports the progression of the tumor.

Since increased HA production is of critical importance for cancer growth and spread, the cellular shift in glucose usage from glucose catabolism to HA anabolism thus represents an important link between diabetes and cancer progression and provides an explanation for the increased incidence of several tumor entities in diabetic patients. These findings may be used to establish a pharmacological therapy for diabetic patients with cancer diseases.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary.....	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Diabetes mellitus.....	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Diabetes mellitus und Tumorprogression	1
1.2 Ösophaguskarzinom.....	4
1.2.1 Einteilung, Epidemiologie und Ätiologie.....	4
1.2.2 Therapieoptionen	4
1.3 Das Hyaluronsäure-System.....	5
1.3.1 Vorkommen und beteiligte Komponenten	5
1.3.2 Hyaluronsäure und Tumorprogression	5
1.3.3 Diabetes und Hyaluronsäure-Synthese	6
1.4 Die Verbindung zwischen Diabetes, Hyaluronsäure und Tumorprogression	8
1.5 Ziele der Arbeit.....	8
2 Material und Methoden.....	9
2.1 Arbeitsmittel.....	9
2.1.1 Substanzen	9
2.1.2 Geräte.....	9
2.1.3 Hersteller	9
2.2 Zellkultur	10
2.2.1 Kultivierung.....	10
2.2.2 Induktion einer Insulinresistenz.....	11
2.2.3 Proliferation	11
2.2.4 Invasion	11
2.2.5 Adhäsionsunabhängiges Wachstum.....	11
2.2.6 Adhäsion an Endothelzellen.....	12
2.3 Biochemische Methoden	12
2.3.1 Immunblots und Immunpräzipitation	12

2.3.2	HA-Quantifizierung.....	13
2.3.3	Glukose-6-Phosphat-Bestimmung	14
2.3.4	Laktat-Bestimmung	14
2.4	Molekularbiologische Techniken	15
2.4.1	qRT-PCR	15
2.4.2	Interferenz-RNA	15
2.5	Statistik	16
3	Ergebnisse.....	17
3.1	Einfluss von Glukose auf die Hyaluronsäure-Synthese	17
3.2	Einfluss von Insulin auf die Hyaluronsäure-Synthese.....	20
3.3	Einfluss der Aktivität der Glykolyse auf die Hyaluronsäure-Synthese.....	23
3.4	Einfluss der Aktivität des Pentosephosphatweges auf die Hyaluronsäure-Synthese.....	24
3.5	Veränderungen von Glykolyse-Metaboliten unter Hemmung von Glykolyse, Insulin-Signalweg und Hyaluronsäure-Synthese.....	26
3.6	Auswirkungen einer erhöhten Hyaluronsäure-Synthese unter diabetischen Bedingungen auf den Tumorzell-Phänotyp <i>in vitro</i>	28
3.6.1	Proliferation	28
3.6.2	Invasion	28
3.6.3	Adhäsionsunabhängiges Wachstum.....	30
3.6.4	Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen	31
4	Diskussion.....	32
4.1	Einfluss von Glukose auf die Hyaluronsäure-Synthese	32
4.2	Einfluss von Insulin auf die Hyaluronsäure-Synthese.....	32
4.3	Einfluss der Aktivität der Glykolyse auf die Hyaluronsäure-Synthese.....	33
4.4	Einfluss der Aktivität des Pentosephosphatweges auf die Hyaluronsäure-Synthese.....	34
4.5	Auswirkungen einer unter diabetischen Bedingungen erhöhten Hyaluronsäure-Synthese auf den Tumorzell-Phänotyp <i>in vitro</i>	35
5	Schlussfolgerung.....	37
6	Literaturverzeichnis.....	38

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Interaktion zwischen Glykolyse und Hyaluronsäure-Synthese	7
Abb. 2 Steigerung der Hyaluronsäure-Menge in Zellkulturüberständen durch erhöhtes Glukose-Angebot und Abwesenheit von Serum.....	17
Abb. 3 Anstieg radioaktiver Hyaluronsäure im Medium nach Zugabe radioaktiv markierter Glukose mit und ohne Anwesenheit von Serum	18
Abb. 4 Steigerung der perizellulären Hyaluronsäure-Menge durch erhöhtes Glukose-Angebot und Abwesenheit von Serum	18
Abb. 5 Transkriptionelle Regulation der HAS-Enzyme durch Glukose.....	19
Abb. 6 Verifizierung der bisherigen Ergebnisse in anderen ESCC-Zelllinien.....	20
Abb. 7 Dosisabhängige Senkung der HA Menge durch Insulin	20
Abb. 8 GLUT1/4 Expression in OSC1-Zellen.....	21
Abb. 9 Transkriptionsunabhängige Steigerung der HA-Synthese durch genetische Herabregulation des Insulin-Rezeptors	21
Abb. 10 Induktion einer Insulinresistenz in OSC1-Zellen durch Langzeit-Insulinbehandlung	22
Abb. 11 Steigerung der Hyaluronsäure-Menge unter experimenteller Insulinresistenz	22
Abb. 12 Steigerung der Hyaluronsäure-Synthese durch Inhibition der Glykolyse .	23
Abb. 13 Korrelationen des Ausmaßes der Glykolyse-Inhibition mit der HAS-Expression	24
Abb. 14 Auswirkung einer Inhibition des Pentosephosphatweges mittels <i>G6PD</i> siRNA auf die Hyaluronsäure-Synthese	25
Abb. 15 Auswirkung einer Inhibition des Pentosephosphatweges mittels <i>TKT</i> siRNA auf die Hyaluronsäure-Synthese	25
Abb. 16 Veränderungen der Glukose-6-Phosphat-Konzentration durch Modulation anderer Glukose-metabolisierender Stoffwechselwege	26
Abb. 17 Laktat als Surrogat-Parameter für die Glykolyse-Aktivität.....	27
Abb. 18 Proliferation unter Einfluss von Glukose und Insulin	28
Abb. 19 Invasion durch Matrigel unter Einfluss von Glukose und Serum	29
Abb. 20 Adhäsionsunabhängiges Wachstum unter Einfluss von Glukose und Serum.....	30
Abb. 21 Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen unter Einfluss von Glukose und Serum.....	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte	9
Tabelle 2 Herstellerverzeichnis.....	9
Tabelle 3 Erstantikörper für Immunblots und Immunpräzipitation	13
Tabelle 4 Zweitantikörper für Immunblots	13
Tabelle 5 qPCR Primer Sequenzen.....	15
Tabelle 6 siRNA Sequenzen.....	16

Abkürzungsverzeichnis

4MU	4-Methylumbelliferon
Akt	Proteinkinase B
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Ereignisse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
DM	Diabetes mellitus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FDG-PET	¹⁸ F-Fluorodeoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukose-Transporter
HA	Hyaluronsäure
HABP	Hyaluronsäure-bindendes Protein
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
IGFR	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor
IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat 1
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
m _M	Molekülmasse, Molekulargewicht
mRNA	Messenger-RNA
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	Interferenz-RNA
T1D	Diabetes Typ 1
T2D	Diabetes Typ 2
TE	Trypsin EDTA
TKT	Transketolase
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen; Tumor-Klassifikation

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Der Diabetes mellitus (DM) ist eine hochprävalente Erkrankung mit weltweit 415 Millionen betroffenen Patienten (2015); für die Zukunft wird ein weiterer Anstieg der Fallzahlen auf geschätzte 642 Millionen im Jahr 2040 approximiert. In Deutschland sind ca. 6,5 Millionen Menschen betroffen [1]. Anhand der Ätiologie kann er in verschiedene Typen eingeteilt werden: Die häufigsten Formen sind mit einem Anteil von ca. 5-10 % der Erkrankten: der DM Typ 1 (T1D), der vermittelt durch eine immunologische Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas zu einem absoluten Insulinmangel und in der Folge zu einer Hyperglykämie führt; der DM Typ 2 (T2D) mit einem Anteil von 90%, bei dem es aufgrund einer Insulinresistenz zu einem relativen und schließlich zu einem absoluten Insulinmangel kommt, was eine Hyperglykämie verursacht und oft mit dem metabolischen Syndrom vergesellschaftet ist. Zusätzlich werden noch weitere Typen und Sonderformen wie LADA (*late autoimmune diabetes in adults*, später Autoimmun-Diabetes des Erwachsenen), MODY (*maturity onset diabetes in the young*, bei Erwachsenen auftretender Jugenddiabetes) und Schwangerschaftsdiabetes (Gestationsdiabetes) unterschieden [2]. DM führt neben einer hyper- bzw. hypoglykämisch bedingten Akutsymptomatik vor allem über Makro- und Mikroangiopathien zu einer Vielzahl an Folgeerkrankungen, die sich in der Erhöhung der Morbidität und Mortalität der betroffenen Patienten ausdrückt [3].

1.1.2 Diabetes mellitus und Tumorprogression

In neueren epidemiologischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen T1D und T2D und verschiedenen Tumorentitäten festgestellt [4]: Leberzellkarzinom [5], Pankreaskarzinom [6], Nierenzellkarzinom [7], Blasenkarzinom [8], Mammakarzinom [9], Prostatakarzinom [10], Endometriumkarzinom [11], Kolorektalkarzinom [12] und Ösophaguskarzinom [13]. Beim Ösophaguskarzinom wurde außerdem eine Assoziation zwischen gesteigertem Nüchternblutzucker und erhöhter Mortalität festgestellt [14, 15]. Für hepatozelluläre Karzinome konnte ein vermindertes Ansprechen auf eine Chemotherapie unter Hyperglykämie nachgewiesen werden [16].

Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind Gegenstand der aktuellen Forschung: Derzeitig werden der direkte Einfluss der Hyperglykämie auf das Tumorzellwachstum,

die anabolen Wirkungen von erhöhten Insulin-Konzentrationen, verursacht durch Pharmakotherapie beim T1D bzw. durch einen transienten Insulinüberschuss in der Anfangsphase des T2D, sowie die durch Adipositas bedingte verstärkte Produktion inflammatorischer Zytokine durch das Fettgewebe als Ursachen angenommen und untersucht [17].

1.1.2.1 Einfluss der pharmakologischen antidiabetischen Therapie auf die Tumorprogression

Hinweise für die oben genannten Mechanismen ergeben sich aus der Erkenntnis, dass die Pharmakotherapie mit Antidiabetika zu einer Modulation der Tumorprogression führt: Insulin und insulinotrope Pharmaka erhöhen die Tumorzinzidenz [18-20], während eine Behandlung mit Metformin das Risiko einer Krebsentstehung [21] und die Mortalitätsrate [22] senkt. Mechanistisch könnten der Wirkung von Metformin auf die Tumorprogression eine Umkehr der Insulinresistenz, die zu geringeren Insulin- und Blutglukosespiegeln führt, sowie die Aktivierung der AMP-Kinase (AMPK) zugrunde liegen. Eine Verbindung zum HA-System ergibt sich aus einer Veröffentlichung, die zeigt, dass AMPK in humanen aortalen glatten Muskelzellen die Hyaluronsäure-Synthase 2 inhibiert [23].

1.1.2.2 Einfluss der Hyperglykämie auf die Tumorprogression

Der direkte Einfluss einer Hyperglykämie auf das Tumorwachstum wurde in den bisherigen Forschungsbemühungen eher vernachlässigt [24]. Dennoch gibt es für eine Beteiligung dieses Mechanismus in der Tumorprogression starke Hinweise: Durch die metabolische Umstellung von mitochondrialer oxidativer Phosphorylierung auf die aerobe Glykolyse (Warburg Effekt) kommt es zu einer weitgehenden Abhängigkeit der Tumorzellen von der Glukoseversorgung [25, 26]. Auch werden durch die chronische Hyperglykämie eine Vielzahl von Signalwegen aktiviert, die die Proliferation und Invasion erhöhen und die Einleitung einer Apoptose inhibieren [24, 27]. Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus ist die Überexpression der Isoform 1 des Glukose Transporters (GLUT-1) mit einer schlechten Prognose assoziiert und korreliert direkt mit einer ungünstigeren Einstufung des Tumors nach Tumor, Nodus, Metastasen (TNM)-Klassifikation [28]. Die ausgeprägte Glukose-Aufnahme von Tumorzellen ist auch die Basis für die ¹⁸F-Fluorodeoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET), die in der Detektion von Metastasen und dem Nachweis einer metabolischen Reaktion auf eine neoadjuvante Chemotherapie bei Ösophaguskarzinomen Verwendung findet [29].

1.1.2.3 Einfluss von Insulin auf die Tumorprogression

Für die Steuerung des Glukose-Metabolismus sind vor allem zwei Insulin-Wirkungen von besonderem Interesse:

1. die Erhöhung der Glukose-Aufnahme in die Zelle und
2. die Förderung der Glukose-Metabolisierung in der Glykolyse und im Pentose-phosphatweg

Ad 1. Ein gut dokumentierter Effekt von Insulin in nicht-malignen Zellen ist die Induktion der Glukose-Aufnahme über eine verstärkte Expression der Isoform 4 des Glukose-Transporters (GLUT4) in der Zellmembran. Diese Wirkung ist insbesondere für Adipozyten und Skelettmuskelzellen belegt [30]. In den meisten Krebszellen findet die Glukose-Aufnahme hingegen über die Insulin-unabhängigen Isoformen GLUT1 und GLUT3 und zu einem geringeren Anteil auch über weitere GLUT Isoformen statt [31]. Diese Umstellung auf eine unkontrollierte Glukose-Aufnahme ist ein wichtiger Teil des Warburg-Effekts [25, 26], der darüber hinaus eine Verlagerung der zellulären Energiegewinnung von der mitochondrialen oxydativen Phosphorylierung hin zur aeroben Laktatfermentation einschließt und mit einer gesteigerten Aggressivität von Tumoren vergesellschaftet ist [32]. Dieser Prozess wird unter anderem von einer Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF-1) verursacht, die die Expression von Glykolyse-fördernden Genen wie *GLUT1/3* und Hexokinase 1-3 (*HK1-3*) erhöht [33].

Ad 2. Wie unter 1. ausgeführt, existiert in den meisten Tumorzellen eine Insulin-unabhängige Glukose-Aufnahme. Weitere Insulin-Wirkungen bleiben allerdings bestehen: Die Steuerung der Metabolisierung von Glukose und die Stimulation der zellulären Proliferation. Diese differenzierten Wirkungen von Insulin werden vor allem über zwei Rezeptoren vermittelt: Der Insulinrezeptor, vor allem Subtyp B, vermittelt die Regulation metabolischer Aspekte über den nachgeschalteten PI3K/Akt Signaltransduktionsweg, während eine Aktivierung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptors (IGFR) über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) wie die Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase (ERK) Wachstumsprozesse anstoßen [34-36]. Die wichtigste metabolische Wirkung von Insulin ist die Aktivierung der Glykolyse über eine Dephosphorylierung des bifunktionalen phosphorylierten 6-Phosphofrukto-2-kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase 1 Proteins (pPFKFB1) [37]. In der Tumorgenese kommt vor allem der proliferationsfördernden Wirkung von Insulin eine wichtige Funktion zu. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass eine native Überexpression des Insulinrezeptor-Subtyps A die Aktivität des IGF-1-Signalweges in Tumorzellen steigert,

was bei Insulin-Stimulation insgesamt zu einem Überwiegen der mitogenen über die metabolische Wirkung führt [38]. Die Wirkung von Insulin auf Metabolismus und Proliferation ist bisher also nicht abschließend untersucht: aufgrund von verschiedenen Mutationsmustern und metabolischen Zuständen ergibt sich ein komplexes Spektrum von möglichen Insulin-Effekten.

1.2 Ösophaguskarzinom

1.2.1 Einteilung, Epidemiologie und Ätiologie

Das Ösophaguskarzinom ist eine schnell voranschreitende Tumorerkrankung und weist trotz chirurgischer und chemotherapeutischer Intervention eine sehr schlechte Prognose mit 5-Jahres-Überlebensraten von unter 30 % auf. Weltweit steht es an sechster Stelle der Krebsodesstatistik und ist der achthäufigste Tumor mit einer stark zunehmenden Tendenz in den letzten Dekaden. Aufgrund des aggressiven Wachstums, des bei Diagnosestellung bereits weit fortgeschrittenen Krankheitsverlaufs und durch die schlechte Behandelbarkeit mit verfügbaren Therapieoptionen entspricht die Mortalitätsrate bei dieser Tumorentität weitgehend der Inzidenzrate. Ungeachtet dieser schlechten Prognose ist das Ösophaguskarzinom bisher nur unzureichend untersucht. Das Ösophaguskarzinom wird in zwei Typen eingeteilt: Adenokarzinome (AC) und Plattenepithelkarzinome (ESCC), die jeweils ca. die Hälfte aller Fälle ausmachen und sich im Hinblick auf Risikofaktoren und Lokalisationen stark unterscheiden [39].

1.2.2 Therapieoptionen

Die Standardtherapie des Ösophaguskarzinoms besteht aus chirurgischer Resektion, Chemoradiotherapie und palliativer Chemotherapie mit Cisplatin, Fluorouracil und Taxanen. Das Ansprechen auf die Chemotherapie hält allerdings nur einige Monate an und die mediane Überlebensrate liegt bei weniger als einem Jahr. Verbesserte chirurgische Verfahren, neoadjuvante Chemotherapie und neue Chemotherapeutika konnten die Ansprechraten verbessern; dennoch beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate immer noch nur ca. 15-25% [39]. Vor diesem Hintergrund ist die Erforschung weiterer Risikofaktoren und Resistenzmechanismen von großer Bedeutung.

1.3 Das Hyaluronsäure-System

1.3.1 Vorkommen und beteiligte Komponenten

Die Hyaluronsäure (HA) ist ein unverzweigtes, langkettiges Polysaccharid aus alternierenden Einheiten D-Glukuronsäure und D-N-Azetylglukosamin und nach Kollagen der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (EZM). HA wird von drei membranständigen Hyaluronsäure-Synthase-Isoformen (HAS1-3) produziert und in den Extrazellulärraum verbracht [40]. Der Abbau von HA wird durch verschiedene Isoformen der Hyaluronidase-Familie vermittelt: die wichtigsten Mitglieder sind die lysosomale HYAL1, die HA zu Di- und Tetrasacchariden abbaut und die HYAL2, ein GPI-verankertes Enzym, das in Lipid-Kavernen auf der Plasmamembran lokalisiert ist, HA bindet, zu 20 kDa (100 Saccharide) Fragmenten abbaut und in die Lysosomen transferiert. Von entscheidender Bedeutung für die oft auch gegensätzlichen biologischen Wirkungen der HA ist die Saccharid-Kettenlänge bzw. das Molekulargewicht: So vermittelt hochmolekulare HA (2×10^3 - 10^5 Saccharid-Einheiten, m_M 4×10^2 - 2×10^4 kDa) die Hydratisierung von Geweben sowie die Unterdrückung von Angiogenese und Immunreaktionen. HA Fragmente hingegen fördern Neoangiogenese, Inflammation und Zellmigration und unterdrücken die Apoptose von Tumorzellen [41, 42]. Ein Großteil dieser HA-Wirkungen wird über HA-Rezeptoren wie CD44, den *receptor for hyaluronan mediated motility* (RHAMM), den *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor* (LYVE), oder den *toll-like receptor 4* (TLR4) vermittelt [43].

1.3.2 Hyaluronsäure und Tumorprogression

HA wirkt nicht tumorinduzierend, unterstützt aber die Tumorgenese durch Unterstützung von Tumorprogression, Neoangiogenese, Metastasierung und Chemotherapie-Resistenz [44]. Eine Überexpression von HAS2 und HAS3 zeigte in einer Vielzahl von Tumorarten wie dem Prostatakarzinom [45], dem Mammakarzinom [46, 47], dem Ösophaguskarzinom [48], dem Kolonkarzinom [49] und dem Osteosarkom [50] eine Assoziation mit einer erhöhten Malignität oder Metastasierung.

Die Aktivität aller drei HAS-Isoformen kann pharmakologisch durch das oral verfügbare niedermolekulare Kumin-Derivat 4-Methylumbelliferon (4MU) inhibiert werden. 4MU senkt die für die HA-Synthese benötigte Menge an intrazellulärer UDP-Glukuronsäure, da es von der UDP-Transferase anstelle der Glukuronsäure an UDP gebunden wird [51]. Die Behandlung mit 4MU verringert im Tiermodell die Metastasierung von Melanomzellen [52], induziert Apoptose im Prostatakarzinom [53], und verbessert das

Ansprechen von Pankreas- und Mammakarzinomen auf eine Chemotherapie [54, 55]. In Ösophaguskarzinomzellen verringert es die Proliferation und führt zu stromalem *Remodelling* [56].

1.3.3 Diabetes und Hyaluronsäure-Synthese

HA wird in der Zelle hauptsächlich aus Vorstufen synthetisiert, die in den ersten Schritten der Glykolyse aus Glukose entstehen. Daher ist es wahrscheinlich, dass die HA-Synthese einerseits von der Glukose-Verfügbarkeit und -Aufnahme und andererseits von der Aktivität anderer Glukose-verbrauchender biochemischer Metabolisierungswege, wie Glykolyse und Pentosephosphatweg, abhängt (Abb. 1).

Das Konzept der Glukose-stimulierten HA-Produktion wurde zuerst in Bakterien [57] nachgewiesen. Mit Hilfe artifizieller HAS Überexpression in COS-1 [58] bzw. MCF-7 Zellen [59] konnte dieser Zusammenhang auch in eukaryotischen Zellen beobachtet werden. *In vivo* zeigt sich in diabetischen Ratten [60] und Patienten mit T1D [61] eine erhöhte HA-Blutkonzentration. Erhöhte HA-Serumspiegel wurden als Surrogat-Parameter für frühe vaskuläre Veränderungen in T2D Patienten identifiziert [62]. Darüber hinaus korreliert die Akkumulation von HA im Muskel mit einer gesteigerten Insulinresistenz; entsprechend führt eine Behandlung mit Hyaluronidase in diesem Modell zu einer Verbesserung der Insulinresistenz [63, 64].

Zu den Wirkungen von Insulin auf die HA-Synthese gibt es bisher keine Daten. Da Insulin aber einen wichtigen Modulator des Glukosestoffwechsels darstellt, könnte es auch ein wichtiger Regulator für die HA-Synthese sein (siehe 1.1.2.3).

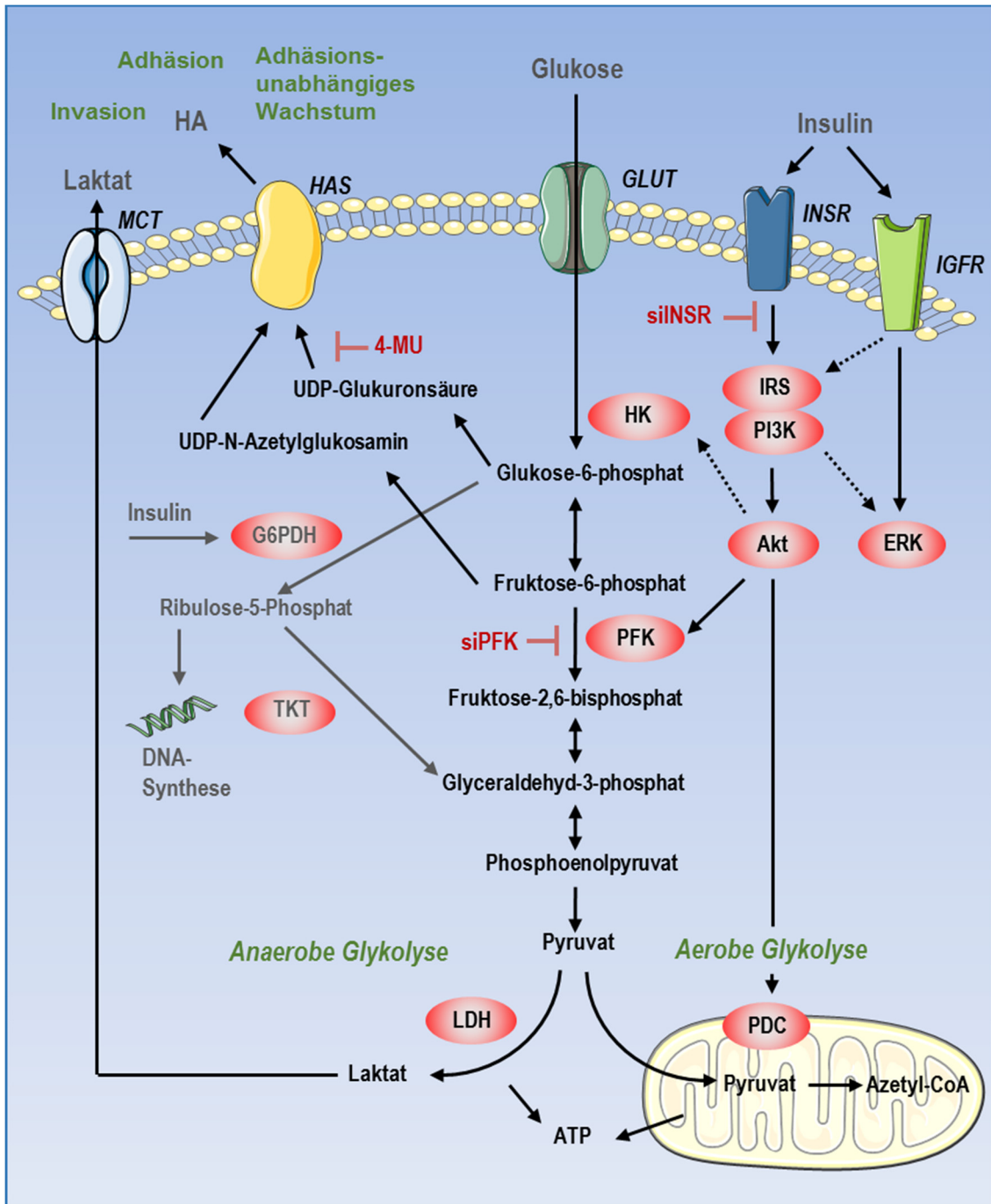


Abb. 1 Interaktion zwischen Glykolyse und Hyaluronsäure-Synthese

Glukose wird in der Zelle in verschiedenen Stoffwechselwegen wie z.B. der Glykolyse, dem Pentosephosphatweg oder der Hyaluronsäure-Synthese metabolisiert. Die Aktivität der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs wird maßgeblich durch Insulin-Signalwege reguliert. In dieser Arbeit wird der Einfluss einer Inhibierung dieser Signal- oder Stoffwechselwege auf die Hyaluronsäure-Synthese untersucht. **4MU** 4-Methylumbelliferon, **ATP** Adenosintriphosphat, **ERK** Extrazellulärsignal-regulierte Kinase, **G6PDH** Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, **GLUT** Glukose-Transporter, **HAS** Hyaluronsäure-Synthase, **HK** Hexokinase, **IGFR** Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor, **INSR** Insulin-Rezeptor, **IRS** Insulin-Rezeptor-Substrat, **MCT** Monocarboxylat-Transporter, **PFK** Phosphofruktokinase, **PI3K** Phosphoinositid-3-Kinase, **TKT** Transketolase, **UDP** Uridindiphosphat.

1.4 Die Verbindung zwischen Diabetes, Hyaluronsäure und Tumorprogression

Da HA tumorfördernde Eigenschaften besitzt, liegt es nahe, dass eine hyperglykämische Stoffwechsellage in Zusammenspiel mit einer vorhandenen Insulinresistenz im Rahmen einer gesteigerten HA-Synthese einen wesentlichen Beitrag zur Aggressivität und Chemotherapie-Resistenz von Tumorzellen leisten könnte. Bisher wurde noch nicht untersucht, ob Hyperglykämie einen Einfluss auf die HA-Produktion von nativen, nicht gentechnisch veränderten, humanen Tumorzelllinien hat. Die Effekte von Insulin mit Hinblick auf die HA-Synthese wurden bisher nicht erforscht. Auch die Auswirkungen dieser Mechanismen im Kontext einer diabetischen Stoffwechsellage auf die Tumorprogression bzw. andere Tumorcharakteristika sind nicht bekannt.

1.5 Ziele der Arbeit

Sowohl Hyperglykämie als auch ein erhöhter Hyaluronsäure-Gehalt in Tumorgeweben sind mit einer gesteigerten Tumorprogression, Metastasierung und Chemotherapie-Resistenz vergesellschaftet.

Die Ziele dieser Arbeit sind daher:

1. Die Untersuchung des Einflusses von Hyperglykämie und Insulin-Depletion auf die Hyaluronsäure-Matrix von Tumorzellen
2. Die Analyse der Auswirkungen der erhöhten Hyaluronsäure-Produktion auf den Tumorphänotyp *in vitro*.

Die Identifizierung von Hyaluronsäure als mögliches Bindeglied zwischen diabetischer Stoffwechsellage und Tumorprogression kann über das genauere Verständnis der beteiligten Mechanismen zu neuen Therapieoptionen für diabetische Patienten mit einer Tumorerkrankung führen.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsmittel

2.1.1 Substanzen

Alle nicht näher spezifizierten Substanzen wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

2.1.2 Geräte

Tabelle 1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absorptionsmessgerät	Syngergy Mx	Biotek
Blot-System	PerfectBlue Semi-Dry	Peqlab
Elektrophorese-System	Mini-PROTEAN 3, PowerPac 200 + 300	Bio-Rad
Kryostat	CM 1850	Leica
Mikroskop, aufrecht	Axio Imager.M2	Zeiss
Mikroskop, invers	Axio Observer.Z1	Zeiss
Fluoreszenz-Scanner	LI-COR Odyssey CLx	LI-COR
Echtzeit-PCR System	7300	Applied Biosystems
RNA-Spektrometer	Nanodrop-1000	Peqlab
Szintillisationszähler	LS6000IC	Beckman-Coulter

2.1.3 Hersteller

Tabelle 2 Herstellerverzeichnis

Hersteller	Hauptsitz
Abcam	Cambridge, UK
Alfa Aesar	Haverhill, MA, USA
Applied Biosystems	Fostercity, CA, USA
Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Biotek	Winooski, Vermont, USA
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Charles River Laboratories	Wilmington, MA, USA
Corgenix Medical Corporation	Broomfield, CO, USA

DAKO	Hamburg, Deutschland
DSMZ	Braunschweig, Deutschland
GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Graphpad Software	La Jolla, CA, USA
Hartmann Analytic	Braunschweig, Deutschland
Leica	Wetzlar, Deutschland
LI-COR	Lincoln, NE, USA
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Perkin Elmer	Waltham, MA, USA
Promocell	Heidelberg, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Saikagaku	Tokyo, Japan
Santa Cruz Biotechnology	Dallas, TX, USA
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Zeiss	Oberkochen, Deutschland

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung

Die primären ösophagealen Plattenepithelkarzinom(ESCC)-Zelllinien OSC1 und OSC2 wurden ursprünglich von Prof. M. Sarbia im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf isoliert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt [65]. Für die meisten Experimente in dieser Arbeit wurde die Zelllinie OSC1 genutzt. Schlüsselexperimente wurden zur Absicherung der Ergebnisse ebenfalls in weiteren ESCC-Zelllinien durchgeführt: Hierzu wurden KYSE-30, KYSE-270, KYSE-410 und KYSE-520 Zelllinien (DSMZ) verwendet. Die Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mit 1,0 g/l Glukose und Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) sowie Zusatz von Penicillin/Streptomycin bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Für diverse Experimente erfolgte die Kultivierung mit 0,0 g/l, 1,0 g/l und 4,5 g/l Glukose. Die Passagierung der Zellen erfolgte durch Ablösung mit 0,5 %iger Trypsin/EDTA-Lösung, gefolgt von einer Aussaat bei einer Dichte von 10.000 Zellen/cm². Die Substanzen zur Kultivierung der Zellen wurden von Gibco, Thermo Fisher Scientific bezogen.

2.2.2 Induktion einer Insulinresistenz

Die Induktion einer artifiziellen Insulinresistenz erfolgte durch Inkubation mit Insulin in einer Endkonzentration von 100 nM (I9278; Sigma-Aldrich) und 4,5 g/l Glukose für drei Tage analog Literaturangaben [66].

2.2.3 Proliferation

Die Proliferationsrate der Tumorzellen wurde anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin in die neu synthetisierten DNA-Stränge bestimmt. Hierzu wurden die Zellen über 24 h mit den Stimuli versetzt und für die letzten 6 h dieses Zeitraums mit $^3\text{[H]}$ -Thymidin (Perkin Elmer) in einer Endkonzentration von 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ versetzt. Daraufhin wurde der Versuch durch Zugabe von kalter 0,3 M Perchlorsäure abgestoppt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und schließlich mit kalter 0,1 M NaOH lysiert. Das Lysat wurde im Anschluss mit einer Szintillisationsflüssigkeit (Rotiszint; Carl Roth) vermischt und die radioaktiven Signale (ausgedrückt in Ereignissen pro Minute; cpm) in einem Szintillisations-Zähler detektiert. Die gemessenen radioaktiven Ereignisse wurden ins Verhältnis zur, mit einem Bradford-Assay (Bio-Rad) bestimmten, Gesamtproteinmenge gesetzt.

2.2.4 Invasion

Die Invasion von Tumorzellen wurde mit dem *BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber Assay* (Cat. 354480; Becton Dickinson) nach Herstelleranleitung bestimmt. Hierzu wurden die Zellen in serumfreiem Medium mit den entsprechenden Stimuli auf die mit Matrigel beschichtete Membran eines Zellkultureinsatzes gegeben. Dieser wurde daraufhin in eine 12-Loch-Kulturschale mit serumhaltigem Medium gesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen und das Matrigel auf der Oberseite der Membran mit einem Wattestäbchen entfernt, die Zellen an der Unterseite mit Hämalaun/Eosin (HE) gefärbt und im Durchlichtmikroskop gezählt.

2.2.5 Adhäsionsunabhängiges Wachstum

Das adhäsionsunabhängige Wachstum von Tumorzellen, die somit keine Anoikis aufweisen, wurde über die Formierung von Kolonien in *Soft-Agar* untersucht. Dazu wurde der Boden einer 24-Loch-Platte mit 0,5 % Agar (BD Difco Agar; Becton Dickinson) in serumhaltigem Medium bedeckt, die Zellen in einer Dichte von 2×10^3 Zellen in einer Mischung aus 0,3 % Agar in Vollmedium suspendiert und auf die erkaltete Agar-Mischung aufgebracht. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Nach drei Wochen wurden die Kolonien mit einem Durchmesser von über 50 μm mit einem Durchlichtmikroskop gezählt.

2.2.6 Adhäsion an Endothelzellen

Die HA-abhängige Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen wurde analog zu einer in der Literatur beschriebenen Methode bestimmt [67] mit dem Unterschied, dass die Quantifizierung der Adhäsion über eine mikroskopische Methode erfolgte. Hierzu wurden humane koronararterielle Endothelzellen (HCAECs; Promocell) in einer 12-Loch-Platte bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Die Tumorzellen wurden mit Calcein ($1 \mu\text{M}$) für 20 min markiert und in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Loch auf die konfluente HCAEC-Schicht ausgesät. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit leichtem Schütteln wurden die Kulturplatten zur Entfernung von nicht gebundenen Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die gebundenen Zellen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie gezählt. Die Beteiligung von HA an der Adhäsion wurde durch eine Behandlung einer zweiten Probe mit 10 U/ml Hyaluronidase (H1136, Sigma-Aldrich) und anschließender Differenzbildung beider Proben errechnet.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Immunblots und Immunpräzipitation

Immunblots wurden analog der Standardmethoden einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit anschließendem Transfer auf Nitrozellulose-Membranen mittels *SemiDry*-Technik durchgeführt. Nach einstündiger Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 3 % BSA in PBS wurde die Membran mit dem Erstantikörper über Nacht inkubiert, darauf dreimalig mit PBS gewaschen und eine weitere Inkubation mit dem Zweitantikörper für eine Stunde vorgenommen. Die im Infrarot-Spektrum fluoreszierenden Zweitantikörper wurden mit einem *Odyssey CLx Infrared Imaging System* (LI-COR) detektiert und das Signal mit der *Odyssey Application Software 3.0* quantifiziert. Phosphorylierte Proteine wurden auf Gesamt-Protein bezogen. Eine Immunpräzipitation erfolgte durch Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper und Zugabe von Agarose-gebundenen IgA/IgG-Antigenen (Pierce Protein A/G Agarose, #20422; Thermo Fisher Scientific). Die gebildeten Antikörper-Agarose-Komplexe wurden nach 12 h Inkubation bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 s bei $1000 \times g$ durch Zentrifugation präzipitiert, der Überstand entfernt und mit dem Präzipitat weitergearbeitet. Die entsprechenden Erst- und Zweitantikörper sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 3 Erstantikörper für Immunblots und Immunpräzipitation

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
Hase anti-IRS-1 (D23G12)	#3407	Cell Signaling Technology
Hase anti-p-IRS-1 (Ser 307)	#2381	Cell Signaling Technology
Maus anti-p-Tyr (PY99)	sc-7020	Santa Cruz Biotechnology
Maus anti-Insulin Rezeptor β	ab69508	Abcam
Maus anti- β -Tubulin I	T7816	Sigma-Aldrich

Tabelle 4 Zweitantikörper für Immunblots

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
IrDye 680RD Ziege anti-Hase	926-68071	LI-COR
IrDye 800CW Ziege anti-Hase	926-32211	LI-COR
IrDye 680LT Ziege anti-Maus	926-68020	LI-COR
IrDye 800CW Ziege anti-Maus	926-32210	LI-COR
IrDye 379BS Katze anti-Maus	926-161216	LI-COR

2.3.2 HA-Quantifizierung

2.3.2.1 HABP-Immunaффinitäts-Assay

HA im Medium von Tumorzellen wurde mit einem kommerziell erhältlichen HA-Bindeprotein (HABP)-Immunaффinitäts-Assay nach Herstellerangaben bestimmt (Corgenix).

2.3.2.2 Radioaktive Bestimmung

Zur Detektion von neu synthetisierter HA wurde eine radioaktive Quantifizierungsmethode gewählt. Die Durchführung erfolgte in leicht abgewandelter Form in Analogie zu einer in der Literatur beschriebenen HA Aufreinigung [68]. Hierzu wurden die Tumorzellen für 24 h mit [^{14}C]-markierter Glukose (20 $\mu\text{Ci/ml}$; Hartmann Analytic) inkubiert. Im Anschluss wurden die HA-Protein-Komplex durch Inkubation mit Pronase (200 $\mu\text{g/ml}$, 8 h) aufgebrochen und die HA in der Hälfte des Extraktes durch Zugabe von boviner Hyaluronidase (10 U/ml, H1136; Sigma-Aldrich) verdaut. Zur Entfernung nicht aufgenommener radioaktiv markierter Moleküle, niedrig-molekularer Zucker und Peptide wurden die Extrakte danach in einem Puffer, bestehend aus 8 M Harnstoff in 20 mM BisTris-Puffer (pH 6, mit Zusatz von 0,2% Triton X-100), auf eine vorher äquibrierte DEAE-Sephacel Säule (GE Healthcare) gegeben. Die HA wurde mit einem Zusatz von

0,3 M NaCl zum Puffer eluiert. Das Eluat wurde mit Szintillisationsflüssigkeit (Rotiszint; Carl Roth) vermischt und die radioaktiven Signale (cpm) in einem Szintillisations-Zähler gemessen. Der HA-Gehalt wurde errechnet als Differenz zwischen radioaktiven Signalen in der unverdauten und der Hyaluronidase-verdauten Probe und anschließend auf den Proteingehalt normalisiert, der parallel dazu mit einem Bradford-Assay (Bio-Rad) quantifiziert wurde.

2.3.2.3 HA-Färbung

Tumorzellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach Versuchsende mit 3,7 %igem Formalin für 20 Minuten fixiert. Zur Immunfärbung wurden unspezifische Bindungsstellen in den Proben jeweils für 1 h mit 3 % BSA in PBS geblockt und nach Waschen mit PBS über Nacht mit Biotin-gekoppeltem HABP (1:250; Saikagaku) inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte nach einem weiteren Waschschriff die einstündige Inkubation mit FITC-markiertem Streptavidin (1:200; DAKO), der nach erneutem Waschen die Kernfärbung mit Hoechst 33342 (1:1000, 2 min, H3570; Thermo Fisher) folgte.

2.3.3 Glukose-6-Phosphat-Bestimmung

Intrazelluläre Glukose-6-Phosphat-Spiegel wurden nach Lyse der Zellen mit einem kommerziell erhältlichen fluorimetrischen Assay (*Glucose-6-Phosphate Assay Kit*, MAK014; Sigma-Aldrich) gemäß Herstellerangaben bestimmt.

2.3.4 Laktat-Bestimmung

Die Laktat-Konzentration im Überstand von zu untersuchenden Zellen wurde mit einem kommerziell erhältlichen fluorimetrischen Assay (*Lactate Assay Kit II*, MAK065; Sigma-Aldrich) gemäß Herstellerangaben bestimmt.

2.4 Molekularbiologische Techniken

2.4.1 qRT-PCR

Gesamt-RNA wurde mittels TRI Reagent (Sigma-Aldrich) gemäß Herstelleranweisungen isoliert und mit *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung erfolgte mit dem *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Thermo Fisher) in einem *7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode [69]. Die hierfür verwendeten Primer-Sequenzen sind in Tabelle 5 beschrieben.

Tabelle 5 qPCR Primer Sequenzen

Gen	Var.	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
G6PD	1,2	CTACCGCATCGACCACTACC	TGTTGTCCCGTTCCAGATG
GLUT1	*	CTGAAGTCGCACAGTGAATA	TGGGTGGAGTTAATGGAGTA
GLUT4	*	CCTGGTCCTTGCTGTGTTCT	CCAGCCACGTCTCATTGTAG
HAS1	1,2	TTCTTCAGTCTGGACTATATTGGGA	CCTGATCACACAGTAGAAATGG
HAS2	*	GTGGGGAAGAATCAAACATTTAAGA	AATGCATCTTGTTTCAGCTCTTG
HAS3	1,3	GGAGGAGGATCCCCAAGTAG	CTGCTCAGGAAGGAAATCCA
INSR	1,2	GCTGCCACCAGTACGTCATT	GTCGATGGTCTTCTCGCCTT
PFKM	1-4	TCATGACCCATGAAGAGCAC	GCACCGGTGAAGATACCAAC
TKT	1-3	ACATTGCCAACATCCGCATG	GATGATGCGGTCACTGGCAT

Var. Transkript-Varianten, *nur eine bekannt; **G6PD**, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; **GLUT1/4** (*SLC2A1/SLC2A4*), Glukose-Transporter 1,4; **HAS1-3**, Hyaluronsäure-Synthase 1-3; **INSR**, Insulin-Rezeptor; **PFKM**, Phosphofruktokinase, Muskel-Typ; **TKT**, Transketolase.

2.4.2 Interferenz-RNA

Die experimentelle Herabregulierung von Zielgenen erfolgte über die Interferenz-RNA-Technik. Hierzu wurden siRNA-Sequenzen gewählt, die eine spezifische Herunterregulation der Expression des Zielgens ohne bioinformatisch zu ermittelnde Beeinflussung von anderen Genen bewirkten (Tabelle 6, Qiagen). Zur Kontrolle wurde eine siRNA eingesetzt, die keine bekannten Ziele im humanen Genom besitzt. Die siRNA wurde mittels Lipotransfektion (RNAiMAX; Thermo Fisher) gemäß Herstelleranweisungen in die Zielzellen eingeschleust. Die Effizienz der Gen-Herabregulierung wurde mittels qRT-PCR verifiziert.

Tabelle 6 siRNA Sequenzen

Ziel-Gen	Transkript-Varianten (Bezeichnung, Nr.)	Qiagen Bestellnummer
Kontrolle	keine	SI03650318
G6PD	NM_000402 (1), NM_001042351 (2)	SI00008855
HAS3	NM_005329 (1), NM_001199280 (3)	SI04201246
INSR	NM_000208 (1), NM_001079817 (2)	SI00004508
PFKM	NM_001166686 (1), NM_001166687 (2), NM_001166688 (3), NM_000289 (4)	SI00604835
TKT	NM_001064 (1), NM_001135055 (2), NM_001135056 (3)	SI02653791

G6PD, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; **HAS3**, Hyaluronsäure-Synthase 3; **INSR**, Insulin-Rezeptor; **PFKM**, Phosphofruktokinase, Muskel-Typ; **TKT**, Transketolase.

2.5 Statistik

Die Daten wurden mit der Software Graphpad Prism 6 (Graphpad Software) ausgewertet. Zwei Datensätze wurden mittels t-Test, mehr als zwei Datensätze mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit nachgeschaltetem *post-hoc*-Test nach Tukey oder Sidak bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Statistische Signifikanz wurde bei einem Wert $P < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Glukose auf die Hyaluronsäure-Synthese

Da HA ausschließlich aus Metaboliten des Glukose-Stoffwechsels synthetisiert wird, wurde zuerst der Einfluss eines erhöhten Glukose-Angebotes auf die HA-Synthese von Tumorzellen untersucht.

Die Stimulation mit zwei verschiedenen Glukosekonzentrationen 1 g/l (5,6 mM) bzw. 4,5 g/l (25 mM), die den Serum-Glukose-Konzentrationen einer normalen bzw. einer diabetischen Stoffwechsellaage entsprechen, ergab eine gesteigerte HA-Menge im Überstand der Tumorzellen. Überraschenderweise zeigte die Anwesenheit von Serum (FCS) einen insgesamt hemmenden Einfluss auf die HA-Konzentration im Medium (Abb. 2).

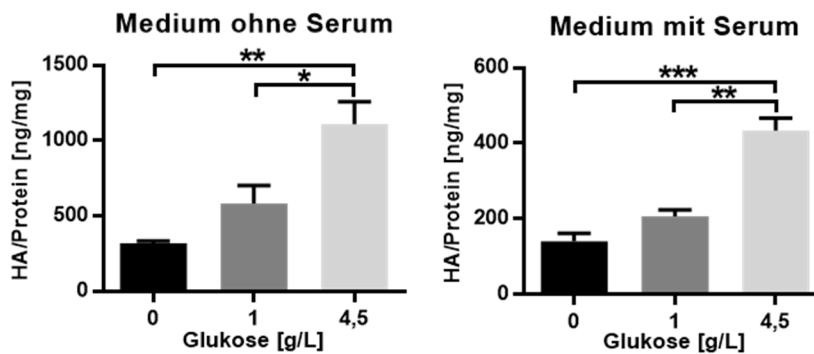


Abb. 2 Steigerung der Hyaluronsäure-Menge in Zellkulturüberständen durch erhöhtes Glukose-Angebot und Abwesenheit von Serum

Glukose steigert dosisabhängig die HA-Menge im Überstand von OSC1-Zellen. Die Anwesenheit von Serum (FCS) führt insgesamt zu einer verringerten HA-Menge im Medium (n=3). HA-Quantifizierung mittels HABP-Assay. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Um nachzuweisen, dass die unter gesteigerten Glukose-Konzentrationen vermehrt produzierte HA im Medium *de novo* aus aufgenommener Glukose erfolgt, wurde ein Ansatz mit radioaktiver Detektion gewählt. Hierfür wurde die zugegebene Glukose ^{14}C -radioaktiv markiert und nach 24 h die Menge radioaktiver HA im Überstand bestimmt. In diesem Versuch zeigte sich wie im vorhergehenden Versuch eine Glukose-Konzentrations-abhängige Steigerung der HA-Menge im Zellüberstand (Abb. 3).

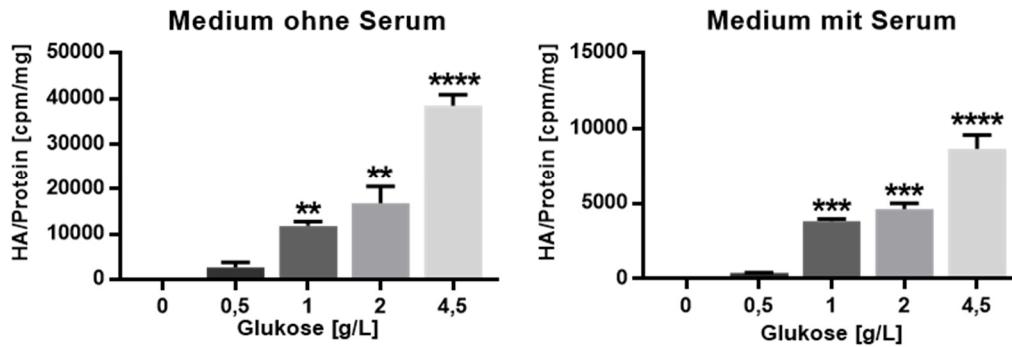


Abb. 3 Anstieg radioaktiver Hyaluronsäure im Medium nach Zugabe radioaktiv markierter Glukose mit und ohne Anwesenheit von Serum

Der Glukosekonzentrations-abhängige Anstieg von radioaktiver *de novo* gebildeter HA im Überstand von OSC1-Zellen durch Einbau radioaktiv markierter Glukose zeigt eine direkte Verwertung der angebotenen Glukose in der HA-Synthese. Die Anwesenheit von Serum (FCS) führt insgesamt zu einer verringerten HA-Menge im Medium ($n = 3$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ im Vergleich zur Glukose-freien Kontrolle.

Zum Nachweis von Veränderungen der perizellulären HA unter Stimulation mit verschiedenen Glukose-Konzentrationen und Serum wurden Affinitäts-Färbungen der HA auf der Zelloberfläche vorgenommen. Auch hier zeigte sich ein Anstieg der HA Menge bei erhöhtem Glukose-Angebot bzw. ein Abfall bei Anwesenheit von Serum (Abb. 4).

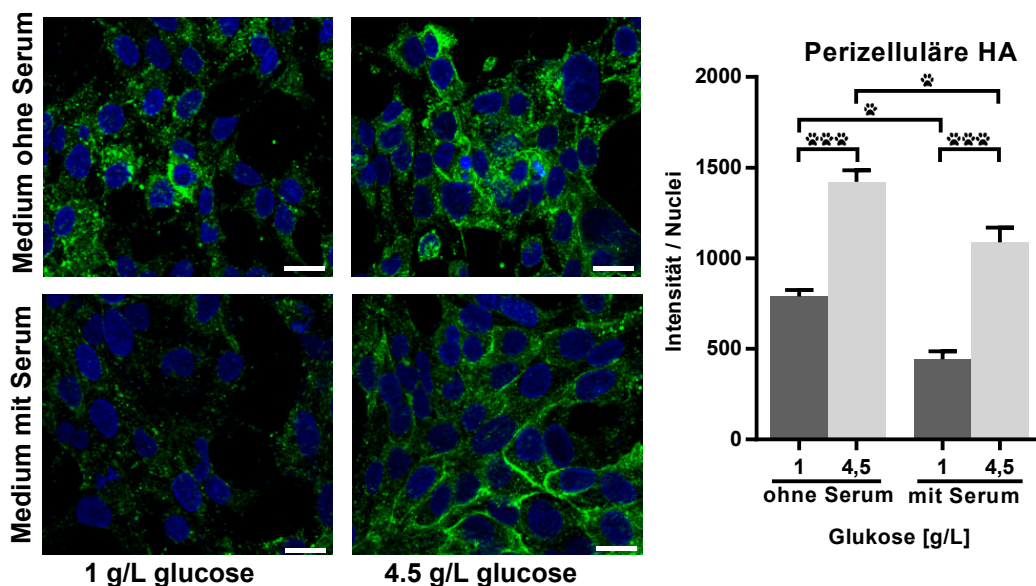


Abb. 4 Steigerung der perizellulären Hyaluronsäure-Menge durch erhöhtes Glukose-Angebot und Abwesenheit von Serum

Glukose steigert dosisabhängig die perizelluläre HA-Menge, während die Anwesenheit von Serum (FCS) diese verringert ($n = 3$). HA-Quantifizierung über Färbung mit HABP. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

Um die Beteiligung von transkriptionellen Veränderungen der HA-Synthase-Gene an den bisher beobachteten Effekten von Glukose auf die HA-Synthese zu überprüfen, wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei den vorhergehenden Versuchen die mRNA-Expressionen der drei HAS-Isoformen *HAS1,2,3* untersucht. *HAS1* konnte unter keinen Bedingungen detektiert werden, während sich unter Glukosestimulation eine deutliche Herunterregulation von *HAS2* aber keine Regulation von *HAS3* fand. Dies zeigt, dass die Glukose-abhängige Zunahme der sezernierten bzw. perizellulären HA-Menge nicht auf einer transkriptionellen Hochregulation der HAS-Enzyme beruht (Abb. 5).

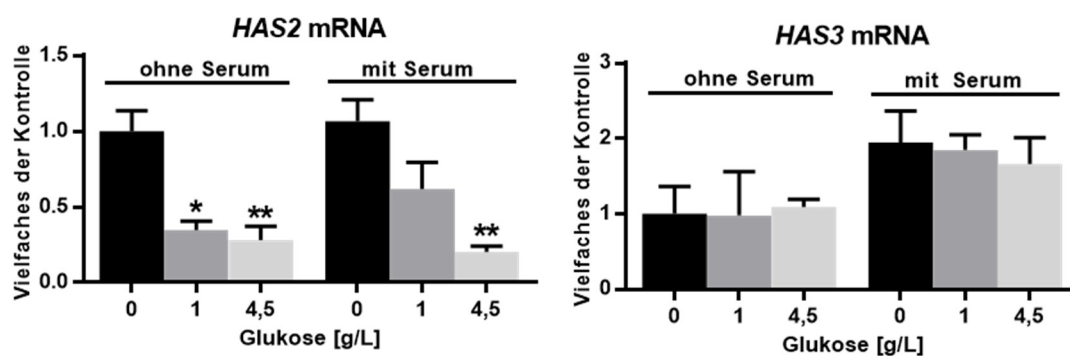


Abb. 5 Transkriptionelle Regulation der HAS-Enzyme durch Glukose

Glukose-Stimulation mit und ohne Serum führt zu einer transkriptionellen Herabregulation von *HAS2*, aber zu keinen Änderungen der *HAS3* Expression (n=3). Quantifizierung der Genexpression von *HAS2* und *HAS3* mit qPCR. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ im Vergleich zur Glukose-freien Kontrolle.

Zur Absicherung der bisherigen Ergebnisse zur Glukose-abhängigen HA-Synthese-Steigerung in OSC1-Zellen wurden diese in insgesamt sechs ESCC-Zelllinien durchgeführt (OSC1, OSC2, Kyse 30, Kyse 270, Kyse 410, Kyse 520). In diesen Versuchen bestätigte sich eine dosisabhängige Zunahme der HA-Synthese unter Glukose-Stimulation, die mit einer verringerten *HAS2*-Genexpression und einer unveränderten *HAS3*-Genexpression einherging. Diese Ergebnisse zeigten sich sowohl mit und als auch ohne Serumzusatz (Abb. 6).

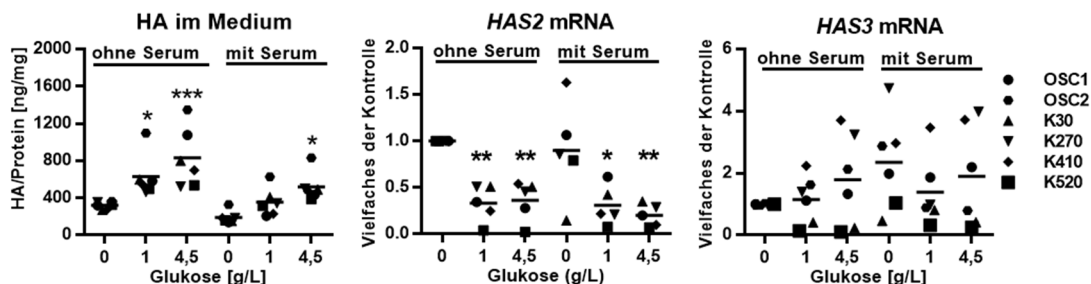


Abb. 6 Verifizierung der bisherigen Ergebnisse in anderen ESCC-Zelllinien

Glukose-Stimulation führt sowohl mit als auch ohne Serumzusatz in einer Grundgesamtheit von $n = 6$ ESCC-Zelllinien (OSC1, OSC2, Kyse 30, Kyse 270, Kyse 410, Kyse 520) zu einer Steigerung der HA-Synthese, einer Abnahme der *HAS2*-mRNA-Expression und keinen Veränderungen in der *HAS3*-mRNA-Expression. Quantifizierung der HA-Menge mit HAP-Assay und der Genexpression von *HAS2* und *HAS3* mit qPCR. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

3.2 Einfluss von Insulin auf die Hyaluronsäure-Synthese

Da die Anwesenheit von Serum eine Verminderung der HA-Synthese zur Folge hatte und Insulin einen wichtigen regulatorischen Stimulus des Glukose-Metabolismus darstellt, wurde im Folgenden untersucht, ob eine Stimulation mit Insulin einen Einfluss auf die unter Glukose-Gabe erhöhte HA-Menge hat. Die Applikation von Insulin führte zu einer dosisabhängigen Verminderung von sezernierter HA unter niedrigen und hohen Glukose-Konzentrationen (Abb. 7).

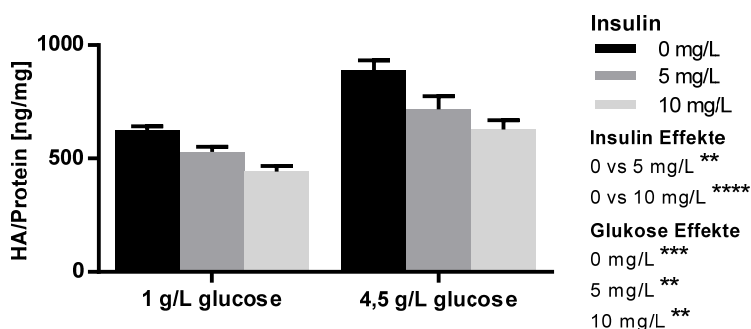


Abb. 7 Dosisabhängige Senkung der HA Menge durch Insulin

Insulin-Stimulation verursacht eine dosisabhängige Senkung der HA-Menge im Überstand sowohl bei niedriger und als auch bei hoher Glukose-Konzentration ($n = 3$). HA-Quantifizierung mittels HAP-Assay. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

Ein wichtiger Insulin-Effekt in nicht-transformierten Zellen ist die Steigerung der Translokation des insulinabhängigen Glukose-Transporters 4 (GLUT4) in die Zellmembran, die eine erhöhte Glukose-Aufnahme in die Zelle vermittelt. Da für eine Vielzahl von Tumoren eine deutliche Überexpression des insulinunabhängigen GLUT1 beschrieben ist, wurde das Verhältnis der *GLUT1* zu *GLUT4* mRNA-Expression bestimmt. Es zeigte sich ein deutliches Überwiegen der *GLUT1*-mRNA-Expression, was eine von Insulin unabhängige Aufnahme der Glukose in die Zelle andeutet (Abb. 8).

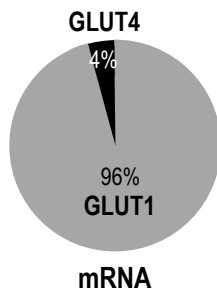


Abb. 8 GLUT1/4 Expression in OSC1-Zellen

Die insulinunabhängige Glukose-Transporter-Isoform *GLUT1* ist auf mRNA-Expressionsebene im Vergleich zum insulinabhängigen *GLUT4* die maßgebliche GLUT-Isoform in OSC1-Zellen (n=3). Quantifizierung der Genexpression mit qPCR. Dargestellt sind gerundete Mittelwerte, genaue Werte: $4,09 \pm 0,53\%$ vs. $95,91 \pm 0,53\%$ (Mittelwert \pm SEM).

Zur Absicherung der Ergebnisse der Insulin-Stimulations-Experimente wurde eine genetische Ausschaltung des Insulin-Rezeptors (*INSR*) mit siRNA vorgenommen. Dieser Versuchsansatz hatte eine deutliche Zunahme der HA-Menge im Medium zur Folge. Gleichzeitig konnten keine Änderungen in der Genexpression von *HAS2* und *HAS3* festgestellt werden (Abb. 9).

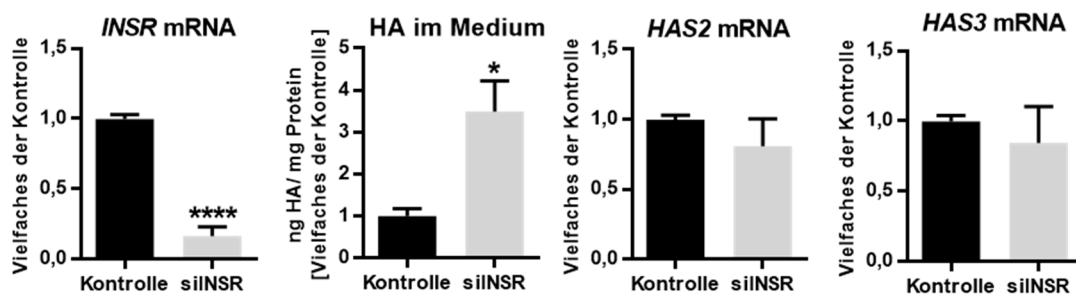


Abb. 9 Transkriptionsunabhängige Steigerung der HA-Synthese durch genetische Herabregulation des Insulin-Rezeptors

Genetische Herabregulation des Insulin-Rezeptors (*INSR*) führt zu einer *HAS2*- und *HAS3*-transkriptionsunabhängigen Steigerung der HA-Synthese (n=4). Quantifizierung der HA-Menge mit HAP- Assay und der Genexpression von *INSR*, *HAS2* und *HAS3* mit qPCR. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontroll-siRNA.

Zur Induktion einer experimentellen Insulinresistenz wurde ein in der Literatur beschriebenes Insulin-Langzeit-Stimulations-Protokoll gewählt (siehe 2.2.2). Der Versuchsansatz wurde anhand der verminderten Phosphorylierung der β -Untereinheit des Insulin-Rezeptors sowie des, dem Insulin-Rezeptor nachgeschalteten, Insulin-Rezeptor-Substrats 1 (IRS-1) verifiziert (Abb. 10).

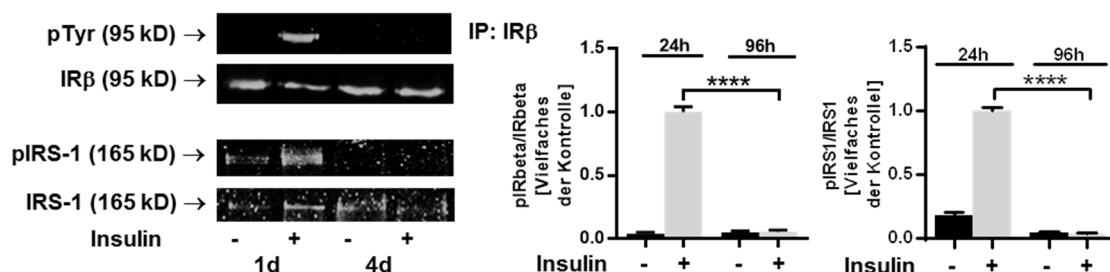


Abb. 10 Induktion einer Insulinresistenz in OSC1-Zellen durch Langzeit-Insulinbehandlung

Eine eintägige Insulin-Stimulation (100 mM) führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung der β -Untereinheit des Insulinrezeptors (IR β) und des Insulin-Rezeptor-Substrates 1 (IRS-1), wohingegen eine viertägige Stimulation zu einer Verringerung der Phosphorylierung führte (n=3). Quantifizierung der Phosphorylierung im Verhältnis zu Gesamtprotein mit Immunblot. Zur Detektion der Phosphorylierung von IR β wurde zuerst eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: ****, $p < 0,0001$.

Die experimentell induzierte Insulinresistenz (viertägige Insulin-Stimulation) führte zu einem deutlichen Anstieg der HA-Menge im Medium, im Vergleich führte eine eintägige Insulin-Stimulation zur Abnahme der HA-Menge im Überstand (Abb. 11, vgl. Abb. 7).

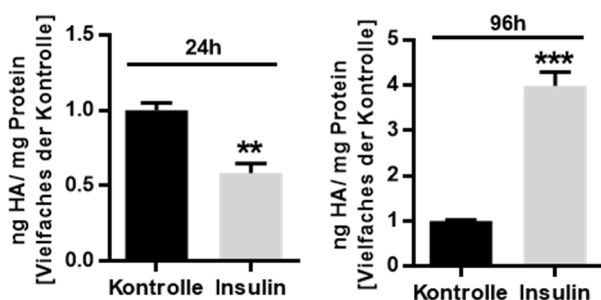


Abb. 11 Steigerung der Hyaluronsäure-Menge unter experimenteller Insulinresistenz

Kurzzeitige Insulin-Stimulation (1 Tag) reduziert die HA-Menge im Überstand, eine Langzeit-Insulin-Stimulation (4 Tage, simulierte Insulinresistenz) steigert diese (n=3). Quantifizierung der HA-Menge mit HABP-Assay. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle.

3.3 Einfluss der Aktivität der Glykolyse auf die Hyaluronsäure-Synthese

In den vorangegangenen Versuchen wurde über die Insulin-Wirkung indirekt die Auswirkung der Aktivität der Glykolyse auf die HA-Synthese gemessen. Dabei wurde vorausgesetzt, dass der hauptsächliche Insulin-Effekt auf den Glukose-Metabolismus über eine Regulation der Glykolyse-Aktivität zustande kommt. Durch die folgenden Versuche sollte dieses Konzept überprüft und ein spezifischer Einfluss der Glykolyse auf die HA-Synthese nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde die Expression der Phosphofruktokinase, Subtyp M (PFKM), ein wichtiges Schlüsselenzym im weiteren Verlauf der Glykolyse, mittels siRNA herunterreguliert. In der Folge ergab sich, wie bereits zuvor bei der Inhibition des Insulin-Signalweges (vgl. 3.2), eine starke Steigerung der HA-Menge im Medium. Ebenfalls kam es zu einer Senkung der *HAS2*-mRNA-Expression wie zuvor unter Glukose-Stimulation detektiert (vgl. 3.1). Überraschenderweise konnte eine transkriptionelle Aufregulation der *HAS3* beobachtet werden, zu der es in vorherigen Versuchen nicht gekommen war (Abb. 12, vgl. Abb. 2, Abb. 5 und Abb. 9).

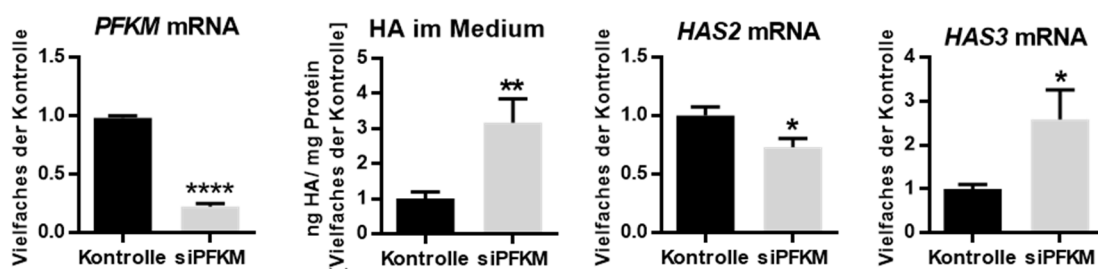


Abb. 12 Steigerung der Hyaluronsäure-Synthese durch Inhibition der Glykolyse

Genetische Herunterregulation des Glykolyse-Schlüsselenzyms *PFKM* führt zu einer Steigerung der HA-Synthese mit gleichzeitiger Herunterregulation von *HAS2* und Aufregulation von *HAS3* mRNA (n=4). Quantifizierung der HA-Menge mit HABP-Assay und der Genexpression von *PFKM*, *HAS2* und *HAS3* mit qPCR. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontroll-siRNA.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre eine dosisabhängige transkriptionelle Rückkopplung der Substratkonzentration auf die Genexpression. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden durch Variation der siRNA-Konzentration verschieden ausgeprägte Herunterregulationen der *PFKM* mRNA vorgenommen und daraufhin die Genexpression von *HAS2* und *HAS3* untersucht. Die Ergebnisse zeigen mit steigender Effizienz der Herunterregulation von *PFKM* eine positive Korrelation mit

HAS3 mRNA (mit einem deutlichen Anstieg bei etwa 10 % der nicht-transfizierten Kontrolle) und eine Tendenz zu einer negativen linearen Korrelation mit *HAS2* mRNA (Abb. 13).

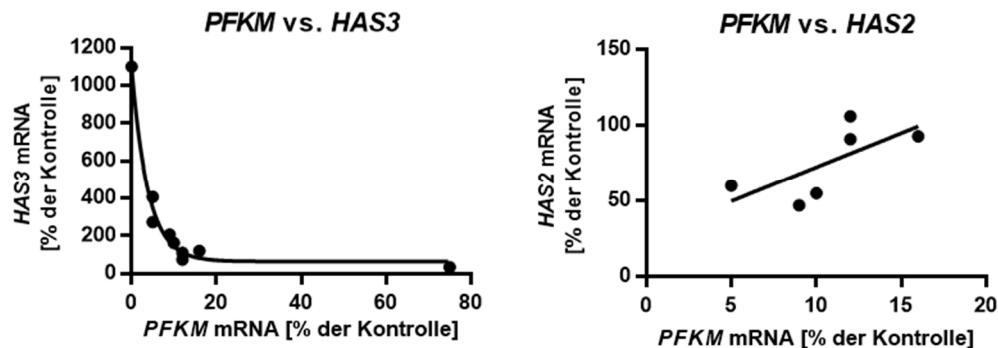


Abb. 13 Korrelationen des Ausmaßes der Glykolyse-Inhibition mit der HAS-Expression

Die Effizienz der Herabregulation der *PFKM* Expression zeigt eine positive Korrelation mit der *HAS3* mRNA (nichtlineare asymptotische Anpassung) und einen Trend ($R^2=0,4643$; $p=0,1361$) zu einer negativen Korrelation mit *HAS2* mRNA.

3.4 Einfluss der Aktivität des Pentosephosphatweges auf die Hyaluronsäure-Synthese

Der Pentosephosphatweg stellt neben der Glykolyse einen weiteren durch Insulin regulierten Stoffwechselweg dar, in dem Glukose metabolisiert wird. Um den Einfluss dieses Weges auf die HA-Synthese zu untersuchen, wurden zwei Schlüsselenzyme, die diesen Weg mit der Glykolyse verbinden, mittels siRNA ausgeschaltet: Die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) wandelt Glukose-6-Phosphat in 6-Phosphogluconolacton und schließlich in Ribulose-5-Phosphat, den Startmetaboliten des reduktiven Teils des Pentosephosphatweges, um. Die Transketolase (TKT) katalysiert die Reaktion von Ribose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat zu Sedoheptulose-7-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat und vermittelt dadurch eine Verknüpfung des oxidativen Teils des Pentosephosphatweges mit der Glykolyse.

Eine genetische Ausschaltung der G6PD führte überraschenderweise zu einer Abnahme der HA-Synthese (Abb. 14), was auf eine Störung der durch den Pentosephosphatweg gestützten Ribonukleotid-Synthese der Zelle zurückzuführen sein könnte.

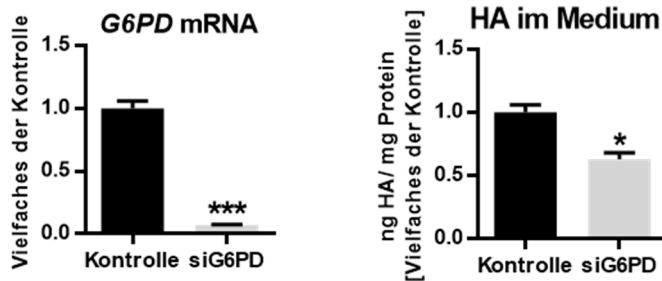


Abb. 14 Auswirkung einer Inhibition des Pentosephosphatweges mittels *G6PD* siRNA auf die Hyaluronsäure-Synthese

Die genetische Herunterregulation des Pentosephosphatweg-Schlüsselenzyms Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (*G6PD*) führt zu einer Verringerung der HA-Synthese, eventuell durch Störung der zellulären RNA und DNA Synthese (n=3). Quantifizierung der HA-Menge mit HABP-Assay und der Genexpression von *G6PD* mit qPCR. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontroll-siRNA.

Unter Ausschaltung der TKT wurde eine schwache Zunahme der HA-Synthese detektiert (Abb. 15). Dieser Effekt könnte durch einen Rückstau von Glukosemetaboliten aus dem Pentosephosphatweg in die Glykolyse verursacht werden.

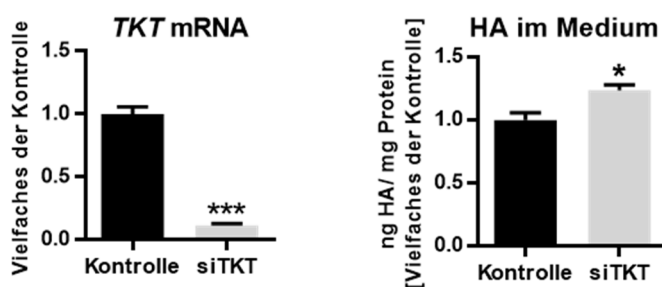


Abb. 15 Auswirkung einer Inhibition des Pentosephosphatweges mittels *TKT* siRNA auf die Hyaluronsäure-Synthese

Die genetische Herunterregulation des Pentosephosphatweg-Schlüsselenzyms TKT führt zu einem leichten Anstieg der HA-Synthese (n=3). Quantifizierung der HA-Menge mit HABP-Assay und der Genexpression von *TKTD* mit qPCR. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontroll-siRNA.

3.5 Veränderungen von Glykolyse-Metaboliten unter Hemmung von Glykolyse, Insulin-Signalweg und Hyaluronsäure-Synthese

Glukose-6-Phosphat (G6P) stellt einen wichtigen Metaboliten der frühen Glykolyse dar und ist zusammen mit Fruktose-6-Phosphat, mit dem es über die Glukose-6-Phosphat-Isomerase im Fließgleichgewicht steht, der Ausgangspunkt sowohl für die weitere Glykolyse und den Pentosephosphatweg als auch für die HA-Synthese. Daher können über die Messung der G6P-Spiegel weitere Informationen über die Auswirkungen der Modulation dieser Stoffwechselwege auf den Glukose-Stoffwechsel erhalten werden. Die Messungen zeigen einen Anstieg der G6P-Spiegel unter der Inhibition der Glykolyse durch Ausschaltung von *PFKM* und des Pentosephosphatweg durch siRNA gegen *G6PD* und *TKT* und einen Trend zu einem Anstieg unter Hemmung der HA-Synthese mit 4MU, was auf einen Rückstau von Glukose-Metaboliten schließen lässt. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen verringert die Induktion der Glykolyse mit Insulin die G6P-Spiegel (Abb. 16).

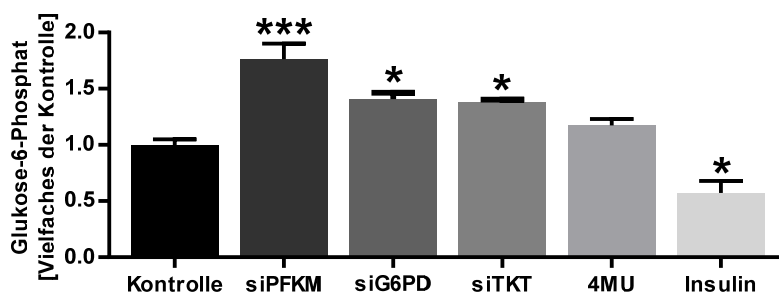


Abb. 16 Veränderungen der Glukose-6-Phosphat-Konzentration durch Modulation anderer Glukose-metabolisierender Stoffwechselwege

Die Inhibition von Glykolyse (siPFKM) und Pentosephosphatweg (siG6PD, siTKT) führt zu einem Anstieg von Glukose-6-Phosphat (G6P), einem wichtigen Metaboliten der frühen Glykolyse. Die Inhibition der HA-Synthese durch den HAS-Inhibitor 4MU zeigte einen Trend zu einem leichten Anstieg von G6P. Insulin führt über eine Steigerung der Glykolyse zu einer Verringerung der intrazellulären G6P-Spiegel (n=3). Quantifizierung von G6P über einen kommerziell erhältlichen fluorimetrischen Assay. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

Aufgrund des Wechsels zur anaeroben Energiegewinnung (Warburg-Effekt) stellt Laktat das wichtigste Endprodukt der Glykolyse in Tumorzellen dar und kann daher als Surrogat-Parameter für die Glykolyse-Aktivität bestimmt werden. Die Messungen zeigen bei Inhibition der Glykolyse mit siRNA gegen *PFKM* einen Abfall und bei ihrer Stimulation

mit Insulin einen Anstieg der Laktat-Konzentration im Zellüberstand; diese Ergebnisse zeigen die erfolgreiche Ausschaltung bzw. Induktion der Glykolyse mit den gewählten Methoden. Die Inhibition des Pentosephosphatweges über Interferenz-RNA gegen *G6PD* und *TKT* erzielte keinen ausgeprägten Effekt. Die Hemmung der HA-Synthese durch 4MU führte zu einem deutlichen Anstieg der Laktat-Spiegel, was über einen verringerten Verbrauch von Glukose-Metaboliten in der HA-Synthese zu erklären ist (Abb. 17).

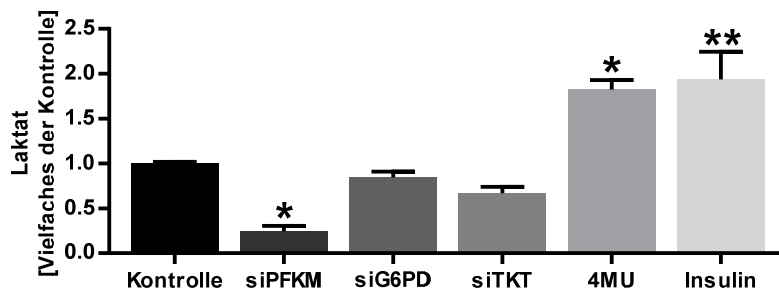


Abb. 17 Laktat als Surrogat-Parameter für die Glykolyse-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Glykolyse erfolgte über die Quantifizierung des Endproduktes Laktat im Medium. Die Inhibition der Glykolyse (siPFKM) führt erwartungsgemäß zu einer Abnahme der Laktatkonzentration im Medium, während die Stimulation der Glykolyse (Insulin) diese erhöht. Eine Inhibition des Pentosephosphatweges (siG6PD, siTKT) erzielt keine signifikante Änderung der Laktatspiegel. Die Inhibition der HA-Synthese (4MU) führt wie Insulin zu einer Erhöhung der Glykolyse-Aktivität (n=3). Quantifizierung von Laktat über einen kommerziell erhältlichen fluorimetrischen Assay. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.6 Auswirkungen einer erhöhten Hyaluronsäure-Synthese unter diabetischen Bedingungen auf den Tumorzell-Phänotyp *in vitro*

3.6.1 Proliferation

Die Proliferationsrate von Tumorzellen stellt einen wichtigen Parameter zur Quantifizierung der Tumorprogression dar. Eine zuverlässige Möglichkeit zur Messung der zellulären Proliferation ist die Erfassung des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin in die während der S-Phase des Zellzyklus neu synthetisierte DNA. In diesem Versuchsaufbau führte die Stimulation mit Insulin erwartungsgemäß zu einer Steigerung der Proliferation von OSC1-Zellen. Zusätzlich zeigte sich eine glukoseabhängige Zunahme der Proliferation (Abb. 18).

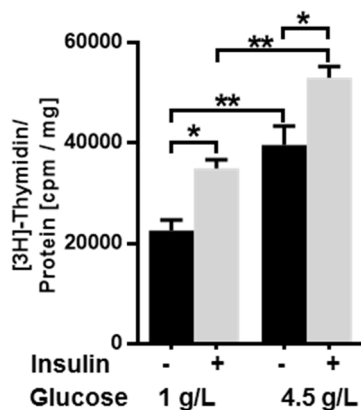


Abb. 18 Proliferation unter Einfluss von Glukose und Insulin

Erhöhte Glukosespiegel führen ebenso wie Insulin-Stimulation zu einer Steigerung der Proliferation von OSC1-Zellen. Proliferation gemessen über den Einbau von radioaktivem [³H]-Thymidin in neu synthetisierte DNA. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

3.6.2 Invasion

Die Invasion von Nachbargeweben stellt ein wichtiges Malignitätskriterium von Tumorzellen dar. Experimentell wird dabei meist stellvertretend die Migration von Tumorzellen durch Matrigel bestimmt. Dies ist eine artifizielle, basalmembranartige Matrix, die aus dem gereinigten Sekret der murinen Sarkom-Zelllinie Engelbreth-Holm-Swarm besteht. HA ist ein wichtiges Molekül für die Invasion von Zellen durch die extrazelluläre Matrix. Daher wurde in den folgenden Experimenten untersucht, inwiefern sich Hyperglykämie und Insulin-Depletion über eine Steigerung der HA-Synthese auf die Invasion durch Matrigel auswirken. Die Experimente zeigten, dass diese Bedingungen zu einer erhöhten Invasion der OSC1-Zellen führten.

Auch eine Inhibition der Glykolyse, sowohl auf direktem Weg durch Ausschaltung von *PFKM* mit siRNA als auch auf indirektem Weg durch Störung der Insulin-Signaltransduktion über siRNA gegen *INSR*, steigerte die Invasion (Abb. 19).

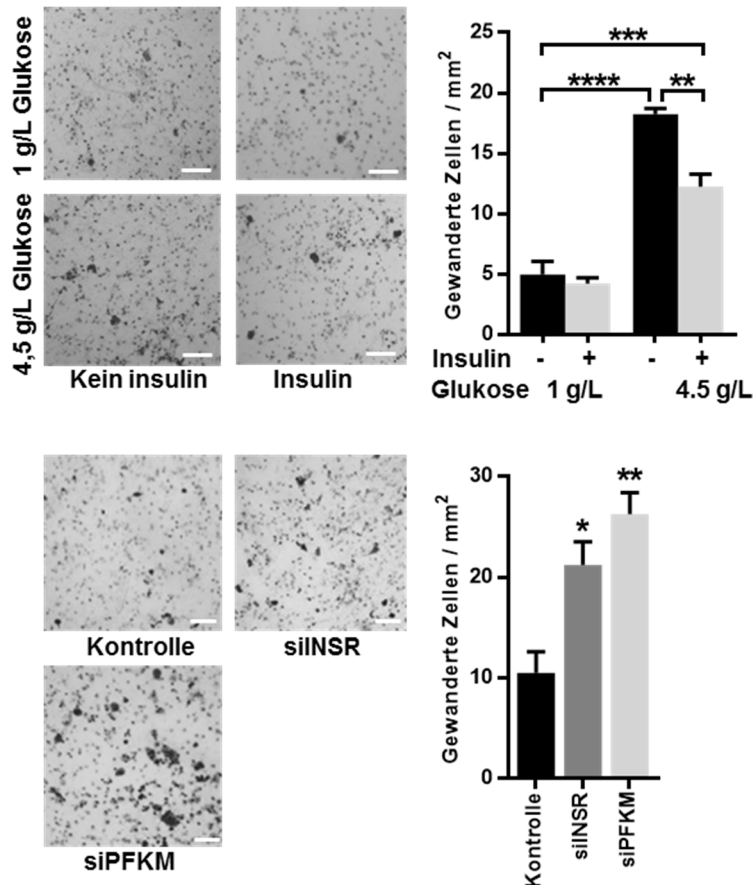


Abb. 19 Invasion durch Matrigel unter Einfluss von Glukose und Serum

Erhöhte Glukosespiegel führen ebenso wie Insulin-Depletion und direkte (siPFKM) und indirekte (siINSR) Inhibition der Glykolyse zu einer Steigerung der Invasion von OSC1-Zellen durch Matrigel. Die Invasion wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Invasions-Assays auf Matrigel-Basis gemessen. Herunterregulation der Genexpression von *INSR* und *PFKM* mit siRNA. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, im unteren Diagramm im Vergleich zur Kontroll-siRNA.

3.6.3 Adhäsionsunabhängiges Wachstum

Das adhäsionsunabhängige Wachstum stellt einen wichtigen Schritt der Tumorzelle in Richtung Metastasierung dar. Während es in nicht-transformierten Zellen bei Ablösung vom Zellverband durch den Verlust von Zell-Matrix-Kontakten zu der Auslösung einer Apoptose kommt, ein Prozess der auch als Anoikis bezeichnet wird, können Tumorzellen diesen Mechanismus unter anderem durch Produktion von HA umgehen. Durch Ausplattieren von Tumorzellen auf einem nicht-adhäsiven Agar und der Auszählung von lebensfähigen Kolonien nach drei Wochen kann diese Fähigkeit der Tumorzellen untersucht werden. Hyperglykämie führte in diesem Versuchsaufbau zu einer vermehrten Bildung von Kolonien. Die Anwesenheit von Insulin senkte die Anzahl der Kolonien, führte aber in Kombination mit hyperglykämischen Bedingungen zu einer stark gesteigerten Koloniegröße (Abb. 20).

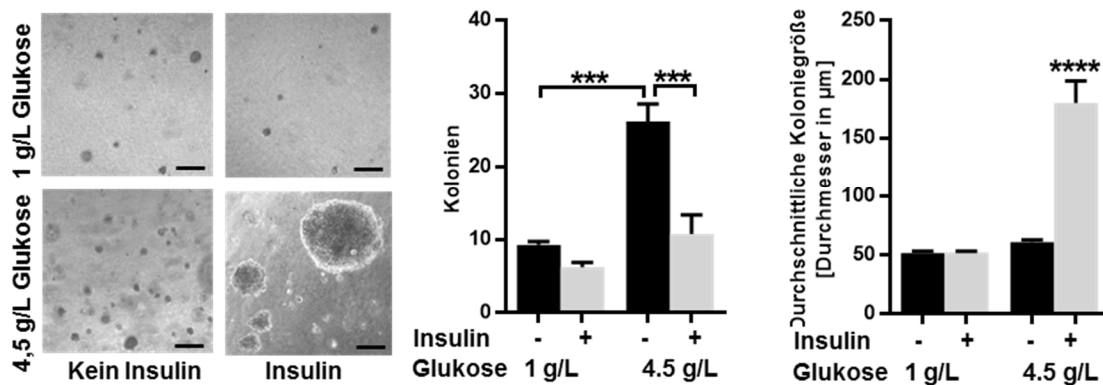


Abb. 20 Adhäsionsunabhängiges Wachstum unter Einfluss von Glukose und Serum

Erhöhte Glukosespiegel führen ebenso wie Insulin-Depletion zu einer Steigerung des adhäsionsunabhängigen Wachstums von OSC1-Zellen auf nicht-adhäsivem Agar. Unter Hyperglykämie und Insulin-Stimulation zeigt sich eine starke Zunahme in der durchschnittlichen Koloniegröße. Gemessen wurden die Anzahl und Größe von nach drei Wochen mikroskopisch erfassbaren Kolonien mit einem Durchmesser über 50 µm im *Soft-Agar-Assay*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, im rechten Diagramm im Vergleich zu allen anderen Bedingungen.

3.6.4 Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen

Ein wichtiger Prozess im Rahmen der Fernmetastasierung eines Tumors ist die Adhäsion von im Blutstrom befindlichen Tumorzellen an Endothelzellen sowie die darauffolgende Invasion in das Zielgewebe. Die Interaktion von Tumorzelle und Endothelzelle wird unter anderem durch HA vermittelt. Daher wurde in den folgenden Versuchen die HA-abhängige Adhäsion von OSC1-Zellen an kultivierte Endothelzellen untersucht. Hyperglykämie und Insulin-Depletion führten ebenso wie eine Inhibition der Glykolyse durch Interferenz-RNA gegen *INSR* und *PFKM* zu einer verstärkten HA-vermittelten Adhäsion der OSC1-Zellen an Endothelzellen (Abb. 21).

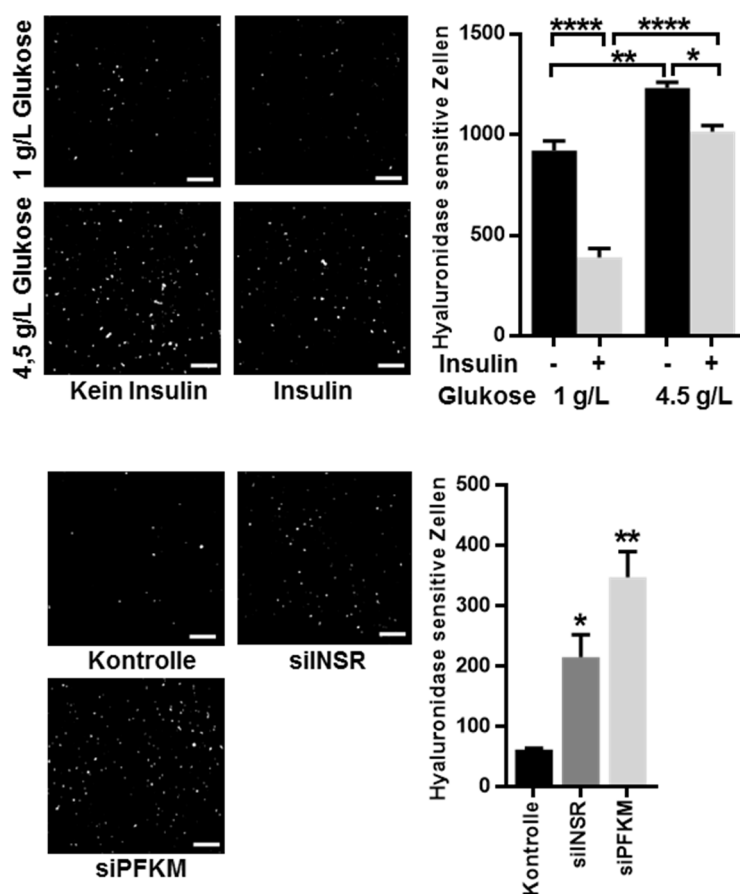


Abb. 21 Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen unter Einfluss von Glukose und Serum

Erhöhte Glukosespiegel führen ebenso wie Insulin-Depletion und direkte (siPFKM) und indirekte (siINSR) Inhibition der Glykolyse zu einer Steigerung der Adhäsion von OSC1-Zellen an Endothelzellen. Die Anzahl der adhären, Calcein-markierten Zellen wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt und die HA-Abhängigkeit des Vorgangs durch Hyaluronidase-Verdau gesichert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, im unteren Diagramm im Vergleich zu Kontroll-siRNA.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von Glukose auf die Hyaluronsäure-Synthese

Die Experimente in Kapitel 3.1 zeigen, dass die HA-Synthese in verschiedenen ESCC-Zelllinien direkt von der Verfügbarkeit der intermediären Glukose-Substrate abhängt. Eine transkriptionelle Regulation der *HAS*-Gene kann als Ursache ausgeschlossen werden, da die mRNA von *HAS2* mit höheren Glukose-Konzentrationen sogar abnahm, während die *HAS3* mRNA keine signifikanten Änderungen aufwies. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Veröffentlichungen, die eine Abhängigkeit der HA-Synthese von den Substraten UDP-Glukuronsäure und UDP-N-Azetylglukosamin zeigen [58, 70, 71]. Die Verringerung der *HAS2* Expression unter höherem Glukoseangebot steht in Analogie zu Ergebnissen von Jokela et al., die diese Beobachtung bei ansteigenden UDP-Glukuronsäure-Spiegeln machten [72]. Diese Abnahme könnte auf einen negativen transkriptionellen Rückkopplungsmechanismus schließen lassen. Im Gegensatz zu COS-1 und MCF-7 Zellen, die eine Glukose-induzierte HA-Synthese nur dann zeigen, wenn *HAS*-Isoformen gentechnisch überexprimiert wurden [58, 59], konnte bei allen in dieser Arbeit untersuchten ESCC-Zelllinien eine starke native Zunahme der HA-Synthese gefunden werden. Dieser Mechanismus könnte damit einen spezifischen, intrinsischen Überlebensvorteil von ESCC-Zellen darstellen.

Die anfangs überraschende Beobachtung einer verringerten HA-Synthese in Gegenwart von Serum im Medium führte zu der Hypothese, dass bestimmte Serum-Bestandteile eine Modulation des Flusses der Glykolyse bewirken und so die Nutzung der Glukose-Metaboliten für die HA-Synthese verringern könnten. Einen der wichtigsten Faktoren für die Modulation des Glukose-Metabolismus in der Zelle stellt dabei das ebenfalls im Serum enthaltene Insulin dar. Diese Hypothese wurde daher in den folgenden Versuchen genauer untersucht.

4.2 Einfluss von Insulin auf die Hyaluronsäure-Synthese

Es stellt sich die Frage, warum verminderte Insulinwirkungen im Rahmen der Tumorprogression eine treibende Rolle spielen könnten, da Insulin als anaboles Hormon erwiesenermaßen eine aktivierende Wirkung auf das Tumorstadium ausübt; so wurde nachgewiesen, dass die Hyperinsulinämie in frühen Phasen des Typ 2 Diabetes die Tumorprogression steigert [34]. Einen neuen Aspekt stellt in diesem Zusammenhang die Entdeckung der partiellen bzw. selektiven Insulinresistenz dar [73]. Zuvor wurde Insulinresistenz als eine vollständige Abnahme aller Insulinwirkungen in der Zielzelle

angenommen. Es konnte allerdings bereits für einige Zielgewebe, wie Leber [74] und Muskel [75], gezeigt werden, dass es nur zu einer teilweisen Störung der Insulinwirkung kommt: Beispielsweise vermittelt in Muskelzellen der PI3K/Akt-Signalweg metabolische Prozesse unabhängig vom mitogenen ERK-Signalweg [76]; eine Abnahme der Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats 1 (IRS-1) reduziert in Patienten mit Typ 2 Diabetes nur den metabolischen PI3K/Akt-Signalweg [75]. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die wachstumsfördernden Wirkungen von Insulin bestehen bleiben können, während die metabolische Steigerung der Glykolyse aufgehoben ist [74, 77]. Durch diesen Vorgang würden vermehrt intermediäre Glukose-Metabolite für andere die Tumorprogression unterstützende Prozesse wie die Synthese von HA verfügbar. Durch eine Kombination von diesen Veränderungen im metabolischen Insulin-Signalweg mit weiter bestehenden mitogenen Wirkungen von Insulin, die z.B. über eine Bindung an den Insulinrezeptor-Subtyp A bzw. IGFR und den nachgeschalteten ERK-Signalweg vermittelt werden, würde die wachstumsfördernde Wirkung mit einer verstärkten HA-Synthese zusammenkommen, was insgesamt die Tumorprogression fördern könnte (siehe auch 1.1.2.3). Eine weitere Möglichkeit für die Aufrechterhaltung einer mitogenen Signaltransduktion trotz eines Verlustes an Insulin-Wirkungen ergibt sich aus der Tatsache, dass Insulin die Proliferation über die Signaltransduktionskaskade Insulin-Rezeptor, GRB2, IRS-1, Ras, ERK aktiviert [78]; abhängig von der Tumorart kommt allerdings in bis zu 63 % der Fälle eine konstitutiv-aktive Variante des Ras-Proteins vor, was zu einer Stimulation der Zellproliferation führt, die unabhängig von der Bindung extrazellulärer mitogener Liganden ist [79]. Das Konzept der partiellen Insulinresistenz wurde bisher noch nicht im Kontext des Tumorwachstums untersucht.

4.3 Einfluss der Aktivität der Glykolyse auf die Hyaluronsäure-Synthese

Die direkte Inhibition der Glykolyse mittels siRNA gegen das Schlüsselenzym der Glykolyse, Phosphofruktokinase, Isotyp M (PFKM) führte erwartungsgemäß zu einer verringerten Aktivität der Glykolyse (Abfall der Laktatkonzentration im Medium) zusammen mit einem Anstieg von Glukose-6-Phosphat, einem frühen Metaboliten der Glykolyse. Gleichzeitig kam es zu einer ausgeprägten Steigerung der HA-Synthese. Dieser Versuch beweist einerseits den starken Stellenwert der Glykolyse in der Metabolisierung von Glukose in der Zelle und andererseits die Abhängigkeit der HA-Synthese von Glukose-Vorstufen. Auf den ersten Blick erscheint eine Inhibition der Glykolyse, die schließlich zu einer verringerten Generierung von ATP führt, abträglich für den Energiehaushalt der Tumorzelle zu sein. Untersuchungen zum Warburg-Effekt

zeigen jedoch, dass bei der klonalen Vermehrung von Tumorzellen die Anhäufung von Biomasse im Vordergrund zu stehen scheint; ein Prozess, der auch aus frühen Glykolyse-Metaboliten gespeist wird [26]. In diesem Zusammenhang bemerkenswert ist die Erkenntnis, dass einige Tumorzellarten das dimere Protein Pyruvatkinase M2 exprimieren, das die Aktivität der Glykolyse reduziert und so die Verfügbarkeit von Glukosemetaboliten steigert [80]. Dieser zelluläre Zustand ist vergleichbar mit den *PFKM Silencing* Experimenten in dieser Arbeit und deutet einen potentiell die Tumorprogression unterstützenden Prozess an, der so auch in nativen Tumorzellen vorkommt.

4.4 Einfluss der Aktivität des Pentosephosphatweges auf die Hyaluronsäure-Synthese

Die Veränderungen der HA-Synthese unter einer Inhibition des Pentosephosphatweges waren teilweise unerwartet. Es wäre zu erwarten, dass die Ausschaltung eines weiteren glukoseverbrauchenden Stoffwechselweges analog zu den Experimenten zur Glykolyse-Inhibition zu einer Steigerung der HA-Synthese führen würde. Dabei fungiert die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) als Eintrittspforte von Glukose-Metaboliten der Glykolyse in den Pentosephosphatweg, während die Transketolase (TKT) eine weiter flussabwärts liegende Verbindung zur Glykolyse darstellt. Es ist allerdings bekannt, dass in Tumorzellen die von der TKT katalysierte Reaktion ebenfalls einen Eintrittspunkt in den Pentosephosphatweg repräsentieren kann [81]. Die Inhibition dieses Enzyms führte tatsächlich auch zu einer Steigerung der HA-Synthese. Diese Beobachtung könnte sowohl über einen Rückstau von Glukose-Metaboliten vom Pentosephosphatweg in die Glykolyse als auch über einen verminderten Abfluss von Glukose-Metaboliten aus der Glykolyse in diesen verursacht sein. Überraschenderweise reduzierte die Inhibition der G6PD die HA-Synthese. Dieser zuerst widersprüchlich erscheinende Befund könnte durch eine unspezifische Störung der zellulären RNA- und DNA-Synthese bedingt sein. Insgesamt deutet sich im Vergleich mit der Inhibition der Glykolyse ein nachgeordneter Stellenwert des Pentosephosphatweges auf die HA-Synthese an.

4.5 Auswirkungen einer unter diabetischen Bedingungen erhöhten Hyaluronsäure-Synthese auf den Tumorzell-Phänotyp *in vitro*

Die Zunahme der HA-Produktion durch hohe Glukosekonzentrationen und Insulin-Depletion führte in der Zellkultur von ESCC-Zellen zu einer Zunahme einer Reihe von Tumorzellcharakteristika, die mit einer Steigerung der Progression und Malignität von Tumorzellen in Verbindung stehen:

1. Proliferation
2. Invasion
3. Adhäsionsunabhängiges Wachstum
4. Adhäsion an Endothelzellen

Ad 1. Erhöhte Glukosekonzentrationen führten zu einer Steigerung der Proliferation. Dieser Effekt könnte durch eine unspezifische Stimulation des Zellmetabolismus oder durch eine Zunahme der HA-Synthese bedingt sein. Die Stimulation mit Insulin verursachte im Gegensatz zu den anderen funktionellen Experimenten in Kapitel 3.6 eine weitere Zunahme des gemessenen Tumorprogressionsparameters, in diesem Fall der Proliferation. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Insulin in der untersuchten ESCC-Zelllinie OSC1 weiterhin mitogene Effekte vermittelt. Dieser Befund lässt vermuten, dass in diesen Zellen die mitogene Wirkung von Insulin immer noch eine Rolle spielt und nicht durch Mutationen, die zu einem konstitutiv-aktiven Ras führen, überflüssig gemacht wurde (vgl. 4.2). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Berichten, dass die Mutationsrate von Ras im Ösophaguskarzinom mit 5 % [79] bzw. in ESCC mit 0,5 % [82] eher gering ausfällt.

Ad 2. Die Fähigkeit zur Invasion stellt ein erstes Malignitätsmerkmal von Tumorzellen dar. Dieses Tumorzellcharakteristikum wurde unter die HA-Produktion erhöhenden Bedingungen gesteigert.

Ad 3. Einen wichtigen Schritt in Richtung Fernmetastasierung stellt die Fähigkeit der Tumorzelle zum Überleben nach Ablösung aus dem Zellverbund dar. In einer nicht-transformierten Zelle würde daraufhin Anoikis, der programmierte Zelltod (Apoptose) durch Verlust von Integrin-Signalen, ausgelöst. Eine Überproduktion an HA-Matrix kann diesen Prozess unterdrücken, da weiterhin *outside-in*-Signalwege angesteuert werden [83]. Interessanterweise zeigte sich zwar unter Bedingungen, die die HA Produktion unterstützen, Hyperglykämie und Abwesenheit von Insulin, eine Zunahme in der Anzahl formierter Kolonien; unter Insulin war die durchschnittliche Koloniegröße allerdings stark

vergrößert. Eine Erklärung für diesen Befund könnte die oben bereits beschriebene mitogene Wirkung von Insulin auf die gebildeten Kolonien sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der größere Anteil von HA in den Kolonien ohne Insulin-Stimulation Zell-Zell-Interaktionen unterdrückt, was die Agglomeration von Kolonien verhindern würde.

Ad 4. Die Adhäsion von im Blutstrom befindlichen Tumorzellen an die Endothelzellen der Gefäße, gefolgt von der Invasion in das Zielgewebe, stellt den letzten Schritt der Fernmetastasierung dar. Dieser Prozess wird unter anderem durch die Bindung von HA an CD44 vermittelt [43]. Tatsächlich zeigt sich unter Bedingungen, die die HA-Produktion fördern, ein Anstieg in der Adhäsion.

Da HA für ihre tumorprogressionsfördernden Eigenschaften bekannt ist, stellen die Ergebnisse der funktionellen *in vitro* Versuche eine Erklärung für die erhöhte Tumoraggressivität unter diabetischen Bedingungen dar [4, 13]. Ebenfalls könnte über die gesteigerte HA-Produktion auch die erhöhte Chemotherapie-Resistenz [16] unter diesen Bedingungen erklärt werden, da für HA auch eine Funktion in diesem Kontext beschrieben ist [83].

5 Schlussfolgerung

Die Experimente in dieser Arbeit zeigen eine neue Verbindung zwischen Diabetes und Tumorprogression auf: Durch Hyperglykämie und verminderte Insulin-Wirkungen, wie sie bei absolutem Insulin-Mangel im Rahmen eines Typ-1-Diabetes oder unter Insulinresistenz unter Typ-2-Diabetes auftreten, werden aufgrund der Inhibition glukoseverbrauchender Stoffwechselwege wie der Glykolyse und des Pentose-phosphatwegs vermehrt intermediäre Glukose-Metabolite verfügbar, die für die HA-Synthese zur Verfügung stehen und so zu einer gesteigerten Produktion von HA durch Tumorzellen führen. Die verstärkte HA-Produktion unterstützt verschiedene Prozesse der Tumorprogression wie Proliferation, Invasion, adhäsionsunabhängiges Wachstum und Adhäsion an Endothelzellen.

Diese Erkenntnisse haben Auswirkungen auf neue Krebstherapie-Konzepte, die die Inhibition der Glykolyse zum Ziel haben [84]: Die Blockade der frühen Glykolyse würde glukoseabhängige Stoffwechselwege wie die HA-Synthese effektiv unterdrücken, wohingegen die Inhibition späterer Glykolyse-Schritte als Nebenwirkung über die Steigerung dieser Stoffwechselwege eine Beschleunigung der Tumorprogression zur Folge haben könnte.

Die Entschlüsselung dieses Mechanismus eröffnet aber auch neue Therapieoptionen, da mit 4-MU ein oral verfügbarer HA-Synthese-Inhibitor mit einem günstigen Nebenwirkungsspektrum zur Verfügung steht, der bei diabetischen Patienten mit Tumorerkrankungen einen vielversprechenden pharmakologischen Therapieansatz darstellen könnte. In zukünftigen Studien soll dieses Konzept *in vivo* in Nacktmaus-Xenograft-Modellen und in klinischen Studien weiter untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas**. 2015.
2. Kerner W, Brückel, J. **Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus**. *Diabetologie und Stoffwechsel*. 2015;10(S 02):S98-S101.
3. Papatheodorou K *et al.* **Complications of Diabetes**. *J Diabetes Res*. 2015;2015:189525.
4. Giovannucci E *et al.* **Diabetes and cancer: a consensus report**. *Diabetes care*. 2010;33(7):1674-85.
5. El-Serag HB *et al.* **The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence**. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(3):369-80.
6. Huxley R *et al.* **Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies**. *Br J Cancer*. 2005;92(11):2076-83.
7. 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):393-7.
8. Larsson SC *et al.* **Diabetes mellitus and risk of bladder cancer: a meta-analysis**. *Diabetologia*. 2006;49(12):2819-23.
9. Larsson SC *et al.* **Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis**. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;121(4):856-62.
10. Kasper JS, Giovannucci E. **A meta-analysis of diabetes mellitus and the risk of prostate cancer**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(11):2056-62.
11. Friberg E *et al.* **Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis**. *Diabetologia*. 2007;50(7):1365-74.
12. Larsson SC *et al.* **Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis**. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(22):1679-87.
13. Huang W *et al.* **Risk of esophageal cancer in diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies**. *Cancer causes & control : CCC*. 2012;23(2):263-72.
14. Jee SH *et al.* **Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women**. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2005;293(2):194-202.
15. 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 medicine*. 2009;6(12):e1000201.
16. Feng YH *et al.* **Diabetes mellitus impairs the response to intra-arterial chemotherapy in hepatocellular carcinoma**. *Med Oncol*. 2011;28(4):1080-8.
17. Vigneri P *et al.* **Diabetes and cancer**. *Endocrine-related cancer*. 2009;16(4):1103-23.

18. Bowker SL *et al.* **Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin.** *Diabetes care.* 2006;29(2):254-8.
19. Currie CJ *et al.* **The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes.** *Diabetologia.* 2009;52(9):1766-77.
20. Monami M *et al.* **Sulphonylureas and cancer: a case-control study.** *Acta diabetologica.* 2009;46(4):279-84.
21. Evans JM *et al.* **Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients.** *BMJ.* 2005;330(7503):1304-5.
22. Landman GW *et al.* **Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16.** *Diabetes care.* 2010;33(2):322-6.
23. Vigetti D *et al.* **Hyaluronan synthesis is inhibited by adenosine monophosphate-activated protein kinase through the regulation of HAS2 activity in human aortic smooth muscle cells.** *The Journal of biological chemistry.* 2011;286(10):7917-24.
24. Duan W *et al.* **Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression.** *Biomed Res Int.* 2014;2014:461917.
25. Warburg O. **On the origin of cancer cells.** *Science.* 1956;123(3191):309-14.
26. Vander Heiden MG *et al.* **Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation.** *Science.* 2009;324(5930):1029-33.
27. Ryu TY *et al.* **Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression.** *Diabetes Metab J.* 2014;38(5):330-6.
28. Kato H *et al.* **Glut-1 glucose transporter expression in esophageal squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness.** *Anticancer research.* 2002;22(5):2635-9.
29. Lordick F *et al.* **PET to assess early metabolic response and to guide treatment of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction: the MUNICON phase II trial.** *The Lancet Oncology.* 2007;8(9):797-805.
30. Goalstone ML, Draznin B. **Insulin signaling.** *West J Med.* 1997;167(3):166-73.
31. Medina RA, Owen GI. **Glucose transporters: expression, regulation and cancer.** *Biological research.* 2002;35(1):9-26.
32. Hockel M, Vaupel P. **Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects.** *Journal of the National Cancer Institute.* 2001;93(4):266-76.
33. Marin-Hernandez A *et al.* **HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms.** *Mini reviews in medicinal chemistry.* 2009;9(9):1084-101.
34. Gallagher EJ *et al.* **The pathway from diabetes and obesity to cancer, on the route to targeted therapy.** *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists.* 2010;16(5):864-73.

35. Samani AA *et al.* **The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights.** *Endocrine reviews.* 2007;28(1):20-47.
36. Nakae J *et al.* **Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors.** *Endocrine reviews.* 2001;22(6):818-35.
37. Probst I, Unthan-Fechner K. **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.** *European journal of biochemistry / FEBS.* 1985;153(2):347-53.
38. Frasca F *et al.* **The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases.** *Archives of physiology and biochemistry.* 2008;114(1):23-37.
39. Pennathur A *et al.* **Oesophageal carcinoma.** *Lancet.* 2013;381(9864):400-12.
40. Itano N *et al.* **Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties.** *The Journal of biological chemistry.* 1999;274(35):25085-92.
41. Erickson M, Stern R. **Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism.** *Biochem Res Int.* 2012;2012:893947.
42. Stern R *et al.* **Hyaluronan fragments: an information-rich system.** *Eur J Cell Biol.* 2006;85(8):699-715.
43. Turley EA *et al.* **Signaling properties of hyaluronan receptors.** *The Journal of biological chemistry.* 2002;277(7):4589-92.
44. Sironen RK *et al.* **Hyaluronan in human malignancies.** *Experimental cell research.* 2011;317(4):383-91.
45. Bharadwaj AG *et al.* **Inducible hyaluronan production reveals differential effects on prostate tumor cell growth and tumor angiogenesis.** *Journal of Biological Chemistry.* 2007;282(28):20561-72.
46. Li Y *et al.* **Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells.** *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2007;120(12):2557-67.
47. Udabage L *et al.* **The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer.** *Experimental cell research.* 2005;310(1):205-17.
48. Twarock S *et al.* **Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells.** *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(30):23276-84.
49. Kim HR *et al.* **Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells in vitro via interaction with CD44.** *Cancer research.* 2004;64(13):4569-76.
50. Tofuku K *et al.* **HAS3-related hyaluronan enhances biological activities necessary for metastasis of osteosarcoma cells.** *International journal of oncology.* 2006;29(1):175-83.

51. Kakizaki I *et al.* **A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone.** *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(32):33281-9.
52. Yoshihara S *et al.* **A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells.** *FEBS letters.* 2005;579(12):2722-6.
53. Lokeshwar VB *et al.* **Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells.** *Cancer research.* 2010;70(7):2613-23.
54. Nakazawa H *et al.* **4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells.** *Cancer chemotherapy and pharmacology.* 2006;57(2):165-70.
55. Palyi-Krek Z *et al.* **Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer.** *European journal of cancer.* 2007;43(16):2423-33.
56. Twarock S *et al.* **Inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma progression by in vivo targeting of hyaluronan synthesis.** *Molecular cancer.* 2011;10:30.
57. Pires AM, Santana MH. **Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid.** *Applied biochemistry and biotechnology.* 2010;162(6):1751-61.
58. Rilla K *et al.* **Hyaluronan synthase 1 (HAS1) requires higher cellular UDP-GlcNAc concentration than HAS2 and HAS3.** *The Journal of biological chemistry.* 2013;288(8):5973-83.
59. Siiskonen H *et al.* **Hyaluronan synthase 1 (HAS1) produces a cytokine-and glucose-inducible, CD44-dependent cell surface coat.** *Experimental cell research.* 2014;320(1):153-63.
60. Chajara A *et al.* **Circulating hyaluronan and hyaluronidase are increased in diabetic rats.** *Diabetologia.* 2000;43(3):387-8.
61. Nieuwdorp M *et al.* **Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis.** *Diabetologia.* 2007;50(6):1288-93.
62. Morita M *et al.* **Close relationship between serum hyaluronan levels and vascular function in patients with type 2 diabetes.** *Biomarkers.* 2014;19(6):493-7.
63. Fogelstrand P, Boren J. **Treatment of hyaluronan accumulation ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance in mice.** *Diabetes.* 2013;62(6):1816-7.
64. Kang L *et al.* **Hyaluronan accumulates with high-fat feeding and contributes to insulin resistance.** *Diabetes.* 2013;62(6):1888-96.
65. Sarbia M *et al.* **Characterization of two newly established cell lines derived from squamous cell carcinomas of the oesophagus.** *Anticancer research.* 1997;17(3C):2185-92.

66. Kumar N, Dey CS. **Development of insulin resistance and reversal by thiazolidinediones in C2C12 skeletal muscle cells.** *Biochemical pharmacology.* 2003;65(2):249-57.
67. Zhang L *et al.* **Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior.** *Cancer research.* 1995;55(2):428-33.
68. Jenkins RH *et al.* **Myofibroblastic differentiation leads to hyaluronan accumulation through reduced hyaluronan turnover.** *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(40):41453-60.
69. Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods.* 2001;25(4):402-8.
70. Jokela TA *et al.* **Mannose inhibits hyaluronan synthesis by down-regulation of the cellular pool of UDP-N-acetylhexosamines.** *The Journal of biological chemistry.* 2008;283(12):7666-73.
71. Vigetti D *et al.* **Modulation of hyaluronan synthase activity in cellular membrane fractions.** *The Journal of biological chemistry.* 2009;284(44):30684-94.
72. Jokela TA *et al.* **Cellular content of UDP-N-acetylhexosamines controls hyaluronan synthase 2 expression and correlates with O-linked N-acetylglucosamine modification of transcription factors YY1 and SP1.** *The Journal of biological chemistry.* 2011;286(38):33632-40.
73. Groop PH *et al.* **Mechanisms of disease: Pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes.** *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism.* 2005;1(2):100-10.
74. Brown MS, Goldstein JL. **Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox.** *Cell metabolism.* 2008;7(2):95-6.
75. Cusi K *et al.* **Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle.** *J Clin Invest.* 2000;105(3):311-20.
76. Lazar DF *et al.* **Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin.** *The Journal of biological chemistry.* 1995;270(35):20801-7.
77. Parker VE *et al.* **Mechanistic insights into insulin resistance in the genetic era.** *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association.* 2011;28(12):1476-86.
78. Skolnik EY *et al.* **The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways.** *Science.* 1993;260(5116):1953-5.
79. Prior IA *et al.* **A comprehensive survey of Ras mutations in cancer.** *Cancer research.* 2012;72(10):2457-67.
80. Mazurek S *et al.* **Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading.** *Seminars in cancer biology.* 2005;15(4):300-8.
81. Zhao J, Zhong CJ. **A review on research progress of transketolase.** *Neurosci Bull.* 2009;25(2):94-9.

82. Shigaki H *et al.* **KRAS and BRAF Mutations in 203 Esophageal Squamous Cell Carcinomas: Pyrosequencing Technology and Literature Review.** *Ann Surg Oncol.* 2013;20:S485-S91.
83. Turley EA *et al.* **Carcinoma Cell Hyaluronan as a "Portable" Cancerized Prometastatic Microenvironment.** *Cancer research.* 2016;76(9):2507-12.
84. Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF. **Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects.** *Molecular cancer.* 2013;12:152.
85. Twarock H. **Zur Resorption von Fluor-Ionen aus leichtlöslichen und schwerlöslichen Fluorsalzen:** Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn; 1964.
86. Bergt B. **Vergleichende potentiometrische Aziditätsbetrachtungen und quantitative Bestimmung organischer Säuren im wasserfreien Medium mit Tetramethylammoniumhydroxidlösung:** Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn; 1966.
87. Heimann G, Twarock-Bergt B, Gladtko E. **[Parameters of the elimination of phenolsulfonphthaleine (phenolred) in children (author's transl)].** *Klin Padiatr.* 1976;188(2):124-30.
88. Twarock R. **Quantum Mechanics on S1 with q-Difference Operators:** Technische Universität Clausthal; 1997.
89. Fahlke M. **Arten und wirtschaftliche Bedeutung der in der Seeschiffahrt benötigten Papiere und Dokumente:** Freie Universität Berlin; 1963.
90. Birte Valentin KF, Maria Grandoch, Jens W. Fischer. **Einfluss einer pharmakologischen Thrombin-Inhibition auf die Morphologie und Inflammation des Fettgewebes im arteriosklerotischen Mausmodell:** medRSD Symposium, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2017.
91. Meinck W. **Die Blumenwiese am Auge des Himmels:** Der Kinderbuchverlag Berlin; 1986.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für die ideelle und praktische Unterstützung dieser Arbeit und für ihre liebevolle Unterstützung. Mein Interesse an der Wissenschaft wurde nicht zuletzt auch durch ihre akademischen Werke geweckt, so dass diese hier Ihnen zu Ehren Erwähnung finden sollen: Dr. rer. nat. Herbert Twarock [85], Dr. rer. nat. Brunhild Twarock-Bergt [86, 87], Dr. rer. nat. Reidun Twarock [88], Maria Fahlke [89], Birte Valentin [90]. Auch für die schon frühe Förderung von Kreativität und Fantasie bin ich sehr dankbar [91].

Herrn Prof. Dr. Jens Fischer danke ich für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit und für die vielen anregenden Diskussionen, die stets neue Ideen zu Tage förderten.

Herrn Prof. Dr. Filler danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Meiner Kollegin Frau Prof. Grandoch möchte ich für die Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit danken.

Allen Kollegen danke ich für die sehr angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre am Institut, die sicherlich zum Gelingen dieser Arbeit in großem Maße beigetragen hat.

Zu guter Letzt danke ich dem geneigten Leser dieser Arbeit für sein Interesse.

Ich freue mich über Kommentare und Anregungen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.