

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
(Univ.-Prof. Dr. B. M. Ghadimi)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

***In-vitro* und *In-vivo*-Charakterisierung
von KAN0438757 als Inhibitor des
glykolytischen Enzyms PFKFB3 im
kolorektalen Karzinom**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Tina Goldhardt

aus

Homberg (Efze)

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuerin: PD Dr. Dr. L.-C. Conradi

Ko-Betreuer: Prof. Dr. Elisabeth Zeisberg

Prüfungskommission

Referentin: PD Dr. Dr. L.-C. Conradi

Ko-Referentin: Prof. Dr. Elisabeth Zeisberg

Drittreferent:

Datum der mündlichen Prüfung: 29.08.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "*In-vitro* und *In-vivo*-Charakterisierung von KAN0438757 als Inhibitor des glykolytischen Enzyms PFKFB3 im kolorektalen Karzinom" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Oliveira T de, **Goldhardt T**, Edelmann M, Rogge T, Rauch K, Kyuchukov ND, Menck K, Bleckman A, Kalucka J, Khan S et al. (2021): Effects of the Novel PFKFB3 Inhibitor KAN0438757 on Colorectal Cancer Cells and Its Systemic Toxicity Evaluation In Vivo. *Cancers (Basel)* 13, 1011

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Kolorektale Karzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Risikofaktoren	1
1.1.3 Krebsentstehung und Adenom-Karzinom-Sequenz	4
1.1.4 Anatomie, Diagnose und Einteilung.....	6
1.1.5 Früherkennung und Vorsorge	8
1.1.6 Therapie.....	9
1.2 Glykolyse und PFKFB3.....	12
1.2.1 Rolle der Glykolyse und PFKFB3 in Tumor(endothel)zellen	12
1.2.2 Die Rolle der Glykolyse und PFKFB3 bei der Tumorstromatisierung	14
1.2.3 PFKFB3-Inhibitoren.....	16
1.3 Ziel der Dissertation.....	20
2 Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.2 Geräte	24
2.1.3 Zelllinien.....	26
2.1.4 Zellkulturreagenzien	26
2.1.5 Reagenzien, Lösungen und Antikörper	28
2.1.6 Kits.....	30
2.1.7 Tiere.....	31
2.1.8 Medikamente	31

2.1.9	Wirkstoffe	31
2.1.10	Computerprogramme und Softwares	32
2.2	Methoden	32
2.2.1	<i>In-vitro</i> -Experimente.....	32
2.2.2	<i>In-vivo</i> -Experimente.....	40
2.2.3	Probenaufbereitung und Färbungen.....	45
2.3	Statistik und Analyse.....	48
3	Ergebnisse	49
3.1	<i>In-vitro</i> -Evaluation von KAN0438757.....	49
3.1.1	Einfluss auf Zellproliferation, Adhärenz, Form und Zellviabilität durch PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757.....	49
3.1.2	Einfluss auf die Zellmorphologie durch PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757.....	52
3.2	<i>In-vivo</i> -Dosistestung von KAN0438757.....	58
3.3	Evaluation von KAN0438757 in PDX-Modellen	63
3.3.1	Auswirkungen der Behandlung auf Gewicht und Verhaltensweisen der PDX-Modelle	63
3.3.2	Auswirkungen der Behandlung auf das Tumorwachstum.....	65
3.3.3	Auswirkungen der PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757 auf die Histologie der Tumoren.....	66
4	Diskussion	73
4.1	Humane Zelllinien als <i>In-vitro</i> -Modelle und PDX als <i>In-vivo</i> -Modelle	73
4.2	Effekte von KAN0438757 <i>in vitro</i>	74
4.2.1	Morphologische Veränderungen und Apoptoseinduktion.....	74
4.2.2	Zelltoxizität und Viabilität.....	75
4.2.3	Invasions- und Migrationsverhalten.....	77
4.3	Effekte von KAN0438757 <i>in vivo</i>	79
4.3.1	Eignung für den Einsatz von KAN0438757 <i>in vivo</i>	79
4.3.2	Chemosensibilisierung mit KAN0438757.....	80

4.3.3	Effekte von KAN0438757 auf das Tumorwachstum und Proliferation.....	81
4.3.4	KAN0438757 führt zu Tumorgefäßnormalisierung.....	82
4.4	Fazit und Ausblick.....	84
5	Zusammenfassung.....	87
6	Anhang.....	89
7	Literaturverzeichnis.....	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erkrankungsrate, Anzahl an Neuerkrankungen und Sterbefälle kolorektaler Karzinome	2
Abbildung 2: Tumorgenese kolorektaler Karzinome – ein genetisches Modell	5
Abbildung 3: Stadienabhängige Therapiekonzepte	11
Abbildung 4: Die Rolle von PFKFB3 und PFKFB4 in der Glykolyse und im Pentosephosphatweg.....	14
Abbildung 5: Tumorgefäße sind strukturell und funktionell abnormal.....	15
Abbildung 6: Tumorgefäßnormalisierung durch PFKFB3-Blockade.....	18
Abbildung 7: Behandlungsschema zur <i>In-vivo</i> -Dosistestung von KAN0438757 in tumorfreien, immunkompetenten Mäusen	421
Abbildung 8: Generierung von PDX-Behandlungsgruppen.....	43
Abbildung 9: Behandlungsschema zur <i>In-vivo</i> -Charakterisierung von KAN0438757 in Kombination mit Oxaliplatin in murinen PDX-Modellen.....	44
Abbildung 10: PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757 beeinflusst Proliferation, Adhärenz, Form und Größe von kolorektalen Tumorzellen und Endothelzellen	50
Abbildung 11: PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757 und 3-PO reduziert konzentrationsabhängig die Zellviabilität in Tumorzellen und Endothelzellen und induziert Zelltod vorrangig in Tumorzellen und geringer in Endothelzellen	521
Abbildung 12: PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 führt zu zellmorphologischen Veränderungen in Tumorzellen und Endothelzellen.....	53
Abbildung 13: PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 hemmt die Migration und Invasion von Tumorzellen	586
Abbildung 14: Evaluation der Toxizität von KAN0438757 in immunkompetenten Mäusen	630
Abbildung 15: PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 zeigt keinen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht.....	64
Abbildung 16: PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 führt zu Hemmung des Tumorwachstums	665
Abbildung 17: PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 in Kombination mit Oxaliplatin und Oxaliplatin allein erhöhen die Rate an nekrotischen Arealen in Tumoren	67
Abbildung 18: Effekte der PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 auf Sauerstoffversorgung und Zellproliferation in Tumoren.....	69

Abbildung 19: Behandlung mit Kombination aus Oxaliplatin und KAN0438757 reduziert hypoxische Areale..... 70

Abbildung 20: Behandlung mit KAN0438757 führt zu Tumorgefäßnormalisierung..... 71

Abbildung 21: Effekte der PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 auf die Anzahl und Lumina der Tumorgefäße und das Endothel..... 72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung Kolorektaler Karzinome	7
Tabelle 2: Ziele der Dissertation - Fragestellung und Hypothesen.....	22
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 4: Geräte.....	24
Tabelle 5: Zelllinien	26
Tabelle 6: Zellkulturreagenzien.....	26
Tabelle 7: Reagenzien, Lösungen, Antikörper.....	28
Tabelle 8: Kits	30
Tabelle 9: Tiere.....	31
Tabelle 10: Medikamente.....	31
Tabelle 11: Wirkstoffe.....	31
Tabelle 12: Computerprogramme und Softwares.....	32
Tabelle 13: Protokoll zur Fixierung und Paraffinisierung	45
Tabelle 14: Protokoll zur Deparaffinisierung bei Hämatoxylin Eosin (H&E)-Färbung.....	45
Tabelle 15: Protokoll zur Deparaffinisierung und Rehydrierung	46
Tabelle 16: Ziele der Dissertation - Antwort.....	84

Abkürzungsverzeichnis

3-PO	3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one
5-FU	5-Fluoruracil
<i>APC</i>	<i>anaphasis promoting complex</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
<i>BRAF</i>	Proto-Onkogen <i>B-Raf</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
C57BL/6	Mäuse der Sorte Black 6
CD31, CD4	<i>cluster of differentiation 31/ 4</i>
CDK1	Zyclin abhängige Kinase 1
CT	Computertomographie
CTB-Assay	<i>CellTiter-Blue®-Cell-Viability-Assay</i>
<i>DCC-Gen</i>	<i>deleted in colorectal cancer- Gen</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleisäure
EC	Endothelzellen
ECM	extrazelluläre Matrix
EGFR	endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
F2,6BP	Fruktose-2,6-Bisphosphat
FA	Fanconi Anämie
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis Coli
FBS	fetal bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-MAb1	<i>FITC conjugated to anti-pimonidazole mouse IgG1 monoclonal antibody</i>
FOLFIRINOX	Folinsäure, 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin
FOLFOX	Folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin
FOLFOXIRI	Folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan

GLUT1	Glucosetransporter 1
HER2	<i>human epithelial growth factor 2</i>
H&E	Hämatoxylin Eosin
HIF1- α	<i>hypoxia inducible factor 1 alpha</i>
HNPCC	hereditär non-polypöses kolorektales Karzinom
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
Ig	Immunglobulin
i.p.	Intraperitoneal
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
<i>KRAS</i>	Onkogen Kirsten <i>rat sarcoma</i>
KRK	kolorektales Karzinom
LDH	Laktatdehydrogenase
MLH1	MutL homolog 1
MMR	Missmatch-Reparatur
MSH	MutS homolog
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NOD-SCID ^{prkdc}	Mäuse der Sorte NOD-SCID
NOD-SCID	<i>not-obese diabetic-severe combined immunodeficiency</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDO	<i>patient-derived-organoids</i>
PDX	<i>patient-derived-xenografts</i>
Pen/ Strep	Penicillin/ Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PFK-15	1-(4-pyridinyl)-3-(2-quinoliny)-2-Propen-1-one
PFKFB	6-Phosphofrukto-2-Kinase/2,6-Bisphosphatase
PMS	<i>postmeiotic segregation protein</i>
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
<i>RAS</i>	Proto-Onkogen <i>rat sarcoma</i>

RCT	Radiochemotherapie
RNA/ mRNA/ siRNA	<i>ribonucleinacid</i> , Ribonukleinsäure/ <i>messenger/ small inter-</i> <i>ferrin</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
s-CEA	Karzino-embryonale Antigen im Serum
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TC	Tumorzellen
TEC	Tumorendothel Zellen
TH ₁	T ₁ -Helferzellen (T-Lymphozyten, CD4 positiv)
Tis	Tumor in situ
TNB	Tris-Natriumchlorid-Block-Puffer
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Das Kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist mit 10,2% der weltweit im Jahr 2018 neu aufgetretenen Krebsfälle nach Lungenkrebs und Brustkrebs die dritthäufigste Krebsart und stellt nach Lungenkrebs mit 9,2% die zweithäufigste Ursache für krebsassoziierte Todesfälle dar. (Bray et al. 2018) Basierend auf den Daten von GLOBOCAN erkrankten im Jahr 2018 1,8 Millionen Menschen an KRK. Davon sind ca. 1 Million Patienten männlich und ca. 800.000 Patienten weiblich. (Bray et al. 2018)

Mit zunehmendem Alter steigen die Erkrankungsraten an. Unter den männlichen Patienten liegt der Altersgipfel bei etwa 72 Jahren. Bei Patientinnen zeigt sich der größte Anteil der Erkrankten in einem Alter über 76 Jahre. (Krebs in Deutschland 2019)

Bei Betrachtung der globalen Verteilung der Inzidenzen, ist eine Häufung vor allem innerhalb Europas, in Australien, Neuseeland, Nordamerika und Ostasien zu verzeichnen. Weniger betroffen sind afrikanische und südasiatische Länder. Diese Verteilung korreliert mit dem Human Development Index: Länder mit einer besseren pro Kopf Entwicklung des Bruttonationaleinkommens, der Lebenserwartung und der Ausbildungszeit, weisen eine höhere Inzidenz auf, weniger weit entwickelte Länder zeigen eine niedrigere Inzidenz. Die Mortalität verhält sich genau entgegengesetzt. (Bray et al. 2018)

Die Erkenntnisse von Arnold et al. (2017) zeigen einen Zusammenhang von höherer Überlebensrate und besseren Behandlungsmethoden bzw. Behandlungsmöglichkeiten, die eher in weiter entwickelten Ländern vorherrschen, als in weniger entwickelten Ländern.

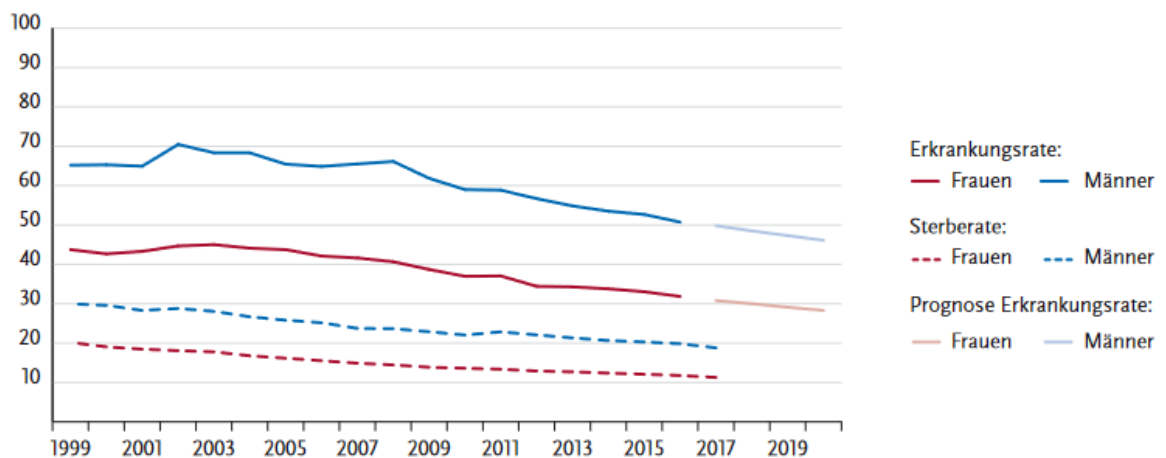
In den vergangenen 20 Jahren zeigte sich jedoch keine signifikante Differenz zwischen Anzahl der Neuerkrankungen und Sterbefällen, sodass sich ein großes Handlungspotenzial der Weiterentwicklung von Prävention und Behandlungsmethoden ergibt. (Abbildung 1)

1.1.2 Risikofaktoren

Das KRK tritt in 85% sporadisch oder mit 15% deutlich seltener familiär gehäuft auf. Meistens können bei familiärer Häufung hereditäre Formen identifiziert werden. Die häufigsten Risikofaktoren für das hereditäre KRK sind Polypose Syndrome wie z. B. die familiäre ade-

nomatöse Polyposis Coli (FAP). Insgesamt macht die FAP jedoch weniger als 1% der KRK aus. (Holinski-Feder und Morak 2010; Stoffel et al. 2015; Half et al. 2009) Die FAP ist gekennzeichnet durch das Auftreten von hunderten bis zu tausenden Polypen und einem 100%igen Lebenszeitrisiko an KRK zu erkranken, wenn nicht frühzeitig präventive Maßnahmen ergriffen werden. Ursächlich ist meist eine autosomal-dominante Keimbahnmutation im *Anaplasia promoting complex (APC)* -Gen. Weitere Formen der FAP sind bekannt, wie die attenuierte FAP und die MUTHY-assoziierte Polyposis (MAP).

A



B

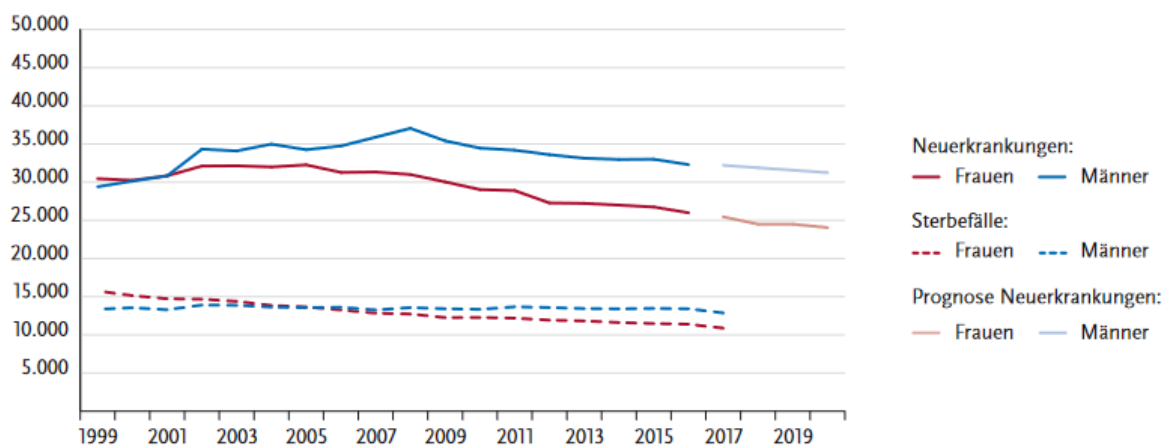


Abbildung 1: Erkrankungsrate, Anzahl an Neuerkrankungen und Sterbefälle kolorektaler Karzinome A: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD-10 C18 – C20, Deutschland 1999 – 2016/2017, Prognose (Inzidenz) bis 2020 je 100.000 (alter Europastandard); B: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle nach Geschlecht, ICD-10 C18 – C20, Deutschland 1999 – 2016/2017, Prognose (Inzidenz) bis 2020. Abbildung übernommen aus Krebs in Deutschland, S 39 (2019)

Das häufigste hereditäre Syndrom ist das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), welches auch als Lynch-Syndrom bezeichnet wird. (Lynch and La Chapelle 2003) Es macht 5 – 8% der KRK aus. 85 – 90% der Betroffenen entwickeln im Mittel mit etwa 45 Jahren KRK, die sich zu 70% im rechten Kolonabschnitt befinden und ein schnelles Wachstum aufweisen. Trotzdem haben diese Patienten meist eine bessere Überlebensrate als bei sporadisch auftretenden KRK. Das HNPCC ist mit vielen weiteren extrakolonischen Tumoren assoziiert. Ursächlich sind autosomal-dominant vererbte Keimbahnmutationen in Genen der Desoxyribonukleisäure (DNA)-Mismatch-Reparatur (MMR). Hauptsächlich MutL homolog 1 (MLH1) und MutS homolog (MSH)2, aber auch MSH6, *postmeiotic segregation protein* (PMS)1 und PMS2 können betroffen sein. (Lynch and La Chapelle 1999; Lynch and La Chapelle 2003; Lynch et al. 1997; Brenner et al. 2014) Diese Gene sind bekanntlich assoziiert mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI).

Eine positive Familienanamnese gilt generell als eigenständiger, wenn auch nicht sehr präziser Risikofaktor. (Taylor et al. 2011)

Weit verbreitet ist die Hypothese, dass chronisch entzündliche Erkrankungen auf lange Sicht zu malignen Erkrankungen führen, wie es auch für Colitis ulcerosa gezeigt werden kann. (Broström et al. 1987; Kinugasa and Akagi 2016) Ebenso können erhöhte Erkrankungsraten bei übergewichtigen Patienten und Patienten mit Diabetes mellitus gefunden werden. (Karahalios et al. 2015; Larsson et al. 2005; Will et al. 1998) Ernährungsgewohnheiten wie z. B. der hohe Konsum von rotem Fleisch (Chan et al. 2011; Chao et al. 2005) oder auch der langjährige Tabakkonsum (Botteri et al. 2008) spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von KRK. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Fasten die Progression von KRK mindert und zu einer besseren Prognose führt. Dabei scheint das Enzym Farnesyl Diphosphat Farnesyltransferase 1 (FDDT1) und der durch *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und *hypoxia inducible factor 1 alpha* (HIF1 α) regulierte Signalweg durch Einfluss auf die aerobe Glykolyse eine zentrale Rolle zu spielen und diese zu einem interessanten Ansatzpunkt zu machen, der für unsere Experimente von besonderem Interesse ist. (Weng et al. 2020)

Neben diesen und vielen weiteren Risikofaktoren, die an dieser Stelle nicht alle benannt werden können, gibt es viele Untersuchungen zu protektiven Faktoren. Diese erscheinen bisher jedoch meist eher inkonsistent. (Finlay A Macrae 2019) Wenige Beispiele sollen kurz benannt werden. Erkenntnisse gibt es dazu, dass physische Aktivität und Bewegung einen protektiven Effekt zeigen. (Wolin and Tuchman 2011) Neben der Einnahme von verschiedenen Vitaminen und Mineralien, verhindert Folsäure die Pathogenese von Krebs. (Choi and Mason 2000) Die protektive Einnahme von Aspirin konnte dosisabhängig positive Auswirkungen aufzeigen,

wird jedoch in Bezug auf Nebenwirkungen kontrovers diskutiert. (Baron et al. 2003; Rothwell et al. 2010)

1.1.3 Krebsentstehung und Adenom-Karzinom-Sequenz

Viele verschiedene Mutationen können dazu führen, dass eine normale Zelle entartet. Diese verschiedenen Schritte verändern eine normale Zelle über milde, moderate und schwerwiegende Dysplasie schließlich in ein invasives Karzinom. (Ilyas and Tomlinson 1996; Fearon und Vogelstein 1990) Da 90% der KRK Adenokarzinome sind, bedeutet das in den meisten Fällen den Ausgang von normalen Epithelzellen über adenomatöse Dysplasien bis hin zum KRK. (Muto et al. 1975; Fleming et al. 2012) Diese Schritte umfassen sowohl den Verlust von Tumorsuppressorgenen als auch die Aktivierung von Protoonkogenen.

Protoonkogene werden durch Mutationen zu Onkogenen und erlangen dadurch meist zusätzliche Funktionen. Dies wird *gain of function* genannt und resultiert z. B. in der dauerhaften Expression eines Proteins, welches den Zellzyklus stimuliert. Sie sind dominant. Eine heterogene Mutation reicht daher aus, um Krebs auszulösen. (Knudson 1985)

Tumorsuppressorgene haben die Funktion, unkontrolliertes Zellwachstum zu verhindern. Wenn sie mutieren, geht diese Funktion verloren. Es kommt zu einem *loss of function*, was in einem Verlust der Zellprogressionskontrolle resultiert. Da Tumorsuppressorgene rezessiv sind, sind dafür meistens zwei Mutationen notwendig. (Knudson 1985) Eine davon kann vererbt sein, sodass Betroffene bereits eine Prädisposition für eine Tumorentwicklung tragen.

Fearon und Vogelstein stellten 1988 die Hypothese auf, dass solche Mutationen in einer bestimmten Reihenfolge auftreten und nannten sie die Adenom-Karzinom-Sequenz. (Abbildung 2) Den ersten Schritt stellt die Mutation des Tumorsuppressorgens *APC* dar, welches auch in der oben benannten FAP mutiert ist. Eine *APC*-Mutation kann bei 60% der KRK gefunden werden und bei 63% der vorangegangenen Adenome. (Powell et al. 1992) *APC* spielt eine wichtige Rolle im *wingless integration gen 1* (Wnt)-Signalweg und hat darüber Einfluss auf die Zellprogression und weitere Zellfunktionen wie Adhäsion, Signaltransduktion, Migration und chromosomale Instabilität. (Fodde 2002)

Im zweiten Schritt verändert sich der Methylierungsstatus der DNA, welcher unter anderem die Genexpression beeinflussen kann. (Bird 2002) Der dritte Schritt bezeichnet die Mutation des Onkogens Kirsten *rat sarcoma* (*KRAS*), welches den Zellen zusammen mit einer *APC*-Mutation einen Wachstumsvorteil bietet. Im Folgenden treten eine Deletion des *deleted in colorectal cancer* (*DCC*)-Gens und weiterhin eine P53-Mutation auf. P53 ist ein Onkogen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 und auch bekannt als „Wächter des Genoms“. Es ermög-

licht, durch einen Arrest des Zellzyklus, die DNA-Reparatur oder kann gegebenenfalls die Apoptose einleiten. Wenn es mutiert ist, können sich geschädigte oder mutierte Zellen ungehindert vermehren (Liu et al. 2013) und letztendlich in Addition zu vorherigen Mutationen das sporadische KKR begründen. (Vogelstein et al. 1988; Fearon und Vogelstein 1990; Ilyas and Tomlinson 1996) P53-Mutationen können bei mehr als 60% der KKR gefunden werden. Diese haben eine schlechtere Prognose. P53 ist als Angriffspunkt der Tumorthherapie Gegenstand der aktuellen Forschung. Erfolge konnten bisher z. B. durch TP53-Ablation erzielt werden, welche das Wachstum und die Invasion der KKR hemmen. (Schulz-Heddergott and Moll 2018; Schulz-Heddergott et al. 2018)

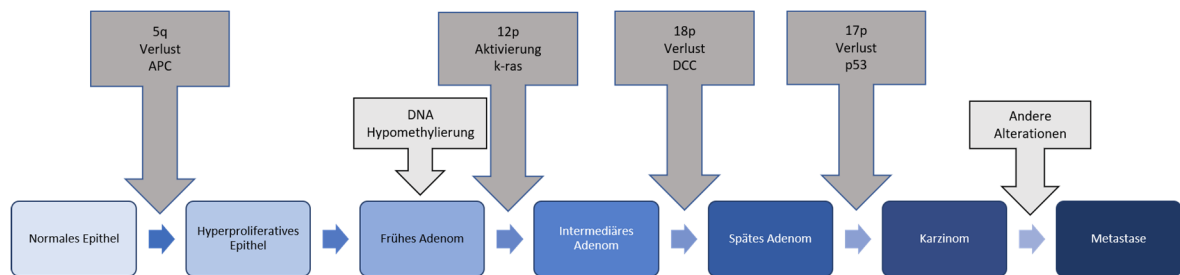


Abbildung 2: Tumorigenese kolorektaler Karzinome – ein genetisches Modell Ablauf der Adenom-Karzinom-Sequenz dargestellt mit möglicher zeitlicher Einordnung der kausalen molekulargenetischen Ereignisse, Abbildung modifiziert nach Fearon und Vogelstein (1990) ©, Abbildung 3: A genetic model for tumorigenesis, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Insgesamt kommt es durch solche Mutationen zu einer chromosomalen Instabilität. In anderen Untersuchungen konnten viele weitere Gene gefunden werden, die ebenfalls durch Mutation und Verlust ihrer Heterozygotie zu chromosomalen Instabilitäten führen. Leslie et al. (2006) zeigten zudem, dass viele verschiedene chromosomale Aberrationen in die Entstehungswege des KKR mit einzubeziehen sind. Diese korrelieren teils mit den Mutationen der Gene, die am häufigsten betroffen sind, können aber auch sporadisch und unabhängig von den Genmutationen auftreten. Dies führt zu der Ergänzung der Hypothese, dass die Karzinomentstehung ein mehrschrittiger Prozess ist, der aber unterschiedliche Schritte umfasst und durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird.

Ein weiterer bekannter Weg ist die Inaktivierung von DNA-Mismatch-Reparatur-Genen. Diese führt zur Mikrosatelliteninstabilität, die bei 15% der KKR nachgewiesen werden kann. (Boland and Goel 2010). Bei HNPCC kommt es durch Keimbahnmutationen in den MMR-Genen und bei der sporadischen MSI durch Methylierungsfehler vor allem in MLH1 in der Folge gehäuft zu Mutationen in Genen, die Mikrosatelliten in kodierenden Bereichen aufwei-

sen. Das kann schließlich in der Entstehung von KRK resultieren. Genauso wie Patienten mit HNPCC, zeigen auch Patienten mit MSI Tumoren eine geringere Mortalitätsrate, die bisher nicht eindeutig erklärt werden kann. (Dietmaier et al. 1997; Boland and Goel 2010)

1.1.4 Anatomie, Diagnose und Einteilung

Wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, entstehen Kolorektale Adenokarzinome auf dem Boden epithelialer Dysplasien, die im Verlauf Polypen bilden. Diese sind zunächst benignen Natur, bergen jedoch zum Teil malignes Potenzial. Die Polypen lassen sich nach ihrer Morphologie, Größe und Verteilung im Intestinum einordnen und unterscheiden sich in ihrer potenziellen Malignität. Die häufigsten tubulären Polypen zeigen das geringste Entartungspotenzial, die selteneren villösen das höchste. Des Weiteren ist aus vielen Studien bekannt, dass das Entartungsrisiko mit der Größe und Anzahl der Polypen korreliert. Patienten mit vielen und/oder großen Polypen entwickeln eher ein KRK. Shinya and Wolff (1979) fassten diese Befunde in einer großangelegten Studie zusammen.

Die endgültige Diagnose eines KRK wird histologisch anhand von endoskopischen Biopsien gestellt. Wie bereits erwähnt, machen Adenokarzinome den größten Anteil aus. Die World Health Organization (WHO) unterteilt konventionelle Adenokarzinome weiterhin nach ihrer Differenzierung in vier Grade. (A1 Anhang) Eine schlechte Differenzierung korreliert mit einer niedrigeren Überlebensrate. (Blenkinsopp et al. 1981)

Sonderformen, wie die häufigen muzinösen Adenokarzinome oder seltenerer siegelringzellige, medulläre und adenosquamöse Karzinome, sollten prognostisch anders betrachtet werden. (Fleming et al. 2012)

Das *Staging* erfolgt bei Kolon- oder Rektumkarzinom durch Ultraschall des Abdomens, Röntgen des Thorax in zwei Ebenen und beim Rektumkarzinom durch eine Computertomographie (CT) des Thorax und Abdomens, sowie eine Magnetresonanztomographie (MRT) des Beckens. Gegebenenfalls ist ein endoskopischer Ultraschall des Rektums zu ergänzen. Diese Untersuchungen sollten zur Abklärung von Metastasen durchgeführt werden, da 18 – 25% der Patienten bereits bei Erstdiagnose Metastasen aufweisen. Am häufigsten finden sich Metastasen in der Leber, im Peritoneum und in der Lunge. Seltener sind Ovarien, Hirn und Knochen betroffen. (Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019; Brenner et al. 2014) Die Einteilung erfolgt nach der Tumor-, Nodus-, Metastase- (TNM) Klassifikation. Dabei steht T für die Tumoreindringtiefe, N für Lymphknotenbetroffenheit und M für den Metastasenstatus. Die genaue Einteilung ist Tabelle A2 im Anhang zu entnehmen.

Eine erweiterte Einteilung in Stadien erfolgt durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) auf der Basis der TNM-Klassifikation. (Tabelle 1) Diese Einteilung dient als Hilfe für die Therapieentscheidung und ist eine erste prognostische Information. Trotz Früherkennungsmethoden werden die meisten KRK erst in den fortgeschrittenen Stadien III oder IV nach UICC diagnostiziert. (Fibbe 2018) Eine genaue Prognose ist jedoch für keinen Patienten vorherzusagen, da sie durch verschiedenste Faktoren beeinflusst wird. Tumormarker wie das Karzinoembryonale Antigen im Serum (s-CEA) dienen als Verlaufsparemeter und können weiterhin Hinweise auf die Prognose liefern. Bei hohen präoperativen Konzentrationen ist das relative Überleben nach Resektion signifikant geringer. Das Risiko einer Metastasierung oder eines Rezidivs ist erhöht. (Park et al. 2005)

Tabelle 1: Stadieneinteilung Kolorektaler Karzinome

Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tumor in situ (Tis)	N0	M0
Stadium 1	T1/T2	N0	M0
Stadium 2	T3/T4	N0	M0
2a	T3	N0	M0
2b	T4a	N0	M0
2c	T4b	N0	M0
Stadium 3	Jedes T-Stadium	N+	M0
3a	T1-T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
3b	T3-T4a	N1	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
3c	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-2	M0
Stadium 4	Jedes T-Stadium	Jedes N-Stadium	M+
4a	Jedes T-Stadium	Jedes N-Stadium	M1a
4b	Jedes T-Stadium	M1b	

Klassifikation Kolorektaler Karzinome nach UICC, Tabelle modifiziert nach Brenner et al. (2014) ursprünglich zitiert aus Weisenberg E. (2017)

Brouwer et al. (2018) zeigten, dass die Fünf-Jahres-Überlebensrate von 1989 bis 2014 von 53% auf 62% angestiegen ist, was unter anderem mit verbesserten Behandlungsmöglichkeiten und Screeningprogrammen zu erklären ist. Mit zunehmendem Stadium bei der Erstdiagnose sinkt die Fünf-Jahres-Überlebensrate: Sind bei einem lokalisierten Tumor nach fünf Jahren noch 90,1% der Patienten am Leben, so sind es bei Befall von Lymphknoten oder angrenzenden Organen noch 69,2% und bei Auftreten von Fernmetastasen nur noch 11,7%. (Siegel et al. 2012). Dies verdeutlicht die Relevanz der Entwicklung weiterer Therapiemöglichkeiten besonders in höheren Tumorstadien und war auch für unsere Untersuchungen von wesentlicher Grundlage.

Weitere Unterschiede sind zwischen den Geschlechtern zu verzeichnen. Frauen haben eine geringfügig höhere Überlebensrate als Männer. (Zentrum für Krebsregisterdaten und Robert-Koch-Institut 2018)

1.1.5 Früherkennung und Vorsorge

Die für Deutschland geltenden Leitlinien empfehlen eine regelmäßige Vorsorge ab dem 50. Lebensjahr. Das immer häufigere Auftreten von KRK auch in jüngeren Jahren, veranlasste die American Cancer Society dazu, schon eine Vorsorge ab dem 45. Lebensjahr zu empfehlen. (Siegel et al. 2017) Auch in Deutschland wird eine solche Änderung anhand von Studien evaluiert. Zudem sind das individuelle Risiko und der Wunsch des Patienten zu berücksichtigen (Wolf et al. 2018; Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019). Als Goldstandard der Screeningmethoden gilt die Koloskopie. In diversen Studien zeigt sie die höchste Spezifität und Sensitivität im Vergleich zu anderen Früherkennungsmethoden. Studien belegen ebenso, dass eine signifikante Senkung der Inzidenz und Mortalität erreicht werden kann. (Kahi et al. 2009; Lin et al. 2016) Vorteil der invasiven Untersuchung ist die sofortige Handlungsmöglichkeit durch Polypektomie oder Biopsieentnahme, ohne einen erneuten Eingriff erforderlich zu machen. Das Komplikationsrisiko besteht größtenteils aus daraus resultierenden Blutungen oder einer möglichen Perforation. (Lin et al. 2016) Bei negativem Testergebnis wird nach S3-Leitlinie und *Guideline* der American Cancer Society eine Wiederholung alle zehn Jahre empfohlen. (Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019; Wolf et al. 2018) Wenn eine komplette Koloskopie vom Patienten abgelehnt wird, ist laut deutscher Leitlinie eine Sigmoidoskopie alle fünf Jahre und zusätzliche eine jährliche Stuhluntersuchung auf okkultes Blut zu empfehlen. Aufgrund der Störanfälligkeit sollte jedoch bei positivem Testergebnis immer eine Koloskopie zur Abklärung angeschlossen werden. Wenn diese bereits durchgeführt wurde, erübrigt sich eine weitere Stuhluntersuchung. (Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019; Guittet et al. 2007)

Aufgrund mangelnder Datenlage werden die DNA-Untersuchung im Stuhl, die Kapselendoskopie und radiologische Screeningverfahren wie CT-Kolonografie bisher nicht zur Früherkennung empfohlen. Die wenigen Studien zeigen jedoch Potenzial und eine Anpassung der Leitlinien ist bei Änderung der Datenlage nicht auszuschließen.

1.1.6 Therapie

Für die Therapie ist es wichtig, zwischen Kolon- und Rektumkarzinom zu unterscheiden. Eine Differenzierung erfolgt mit dem starren Rektoskop. Ein Karzinom gilt dem Rektum zugehörig, wenn sein aboraler Rand 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt liegt. Das Rektum wird in Drittel eingeteilt. Tumore die weiter als 16 cm von der Anokutanlinie entfernt liegen, werden als Kolonkarzinome bezeichnet. (Wu 2007)

Die Therapieentscheidung sollte interdisziplinär in einer Tumorkonferenz von mehreren Fachdisziplinen gemeinsam getroffen werden. Therapeutischer Goldstandard ist zunächst die radikalchirurgische Resektion. Dafür wird im Kolon meist eine komplette mesokolische Exzision (CME) vorgenommen. Möglicherweise befallene Lymphknoten befinden sich entlang der Gefäße, sodass sich das Resektionsausmaß aus der Durchtrennung der zentralen Arterien ergibt. (Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019) Auch Teile des Omentum majus müssen oftmals mit entfernt werden. Der Tumor selbst sollte mit allen Anteilen und notfalls multiviszeral *en-bloc* entfernt werden, um eine Tumorzell dissemination zu verhindern. (Kruschewski et al. 2006)

Beim Rektumkarzinom wird eine ähnliche Vorgehensweise empfohlen. Bei Befall des mittleren und unteren Drittels wird nach stadienabhängiger Vorbehandlung, welche im Folgenden näher erläutert wird, eine totale mesorektale Exzision (TME) durchgeführt. Nach Möglichkeit sollte immer ein Sphinktererhalt angestrebt werden. Bei Befall des oberen Rektumdrittels ist eine partielle mesorektale Exzision (PME) ausreichend, wenn ein Sicherheitsabstand nach distal von mindestens 5 cm zum Tumor eingehalten werden kann. Nach neoadjuvanter Therapie kann der Sicherheitsabstand auf 0,5 cm verkürzt werden. Dann sollte die Tumorfreiheit des aboralen Randes durch einen intraoperativen Schnellschnitt evaluiert werden. (Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019)

Anschließend an eine erfolgreiche Resektion mit R0 Status, also vollständige Tumorentfernung, wird Patienten mit Kolon- und oder Rektumkarzinomen im UICC Stadium III oder Stadium II mit zusätzlichen Risikofaktoren, wie einem erhöhtem Rezidivrisiko oder Tumorperforation, eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Diese senkt die Rezidivrate und schafft einen Überlebensvorteil. (Group 2007) Als Standardtherapie wird eine Kombination

aus 5-Fluoruracil (5-FU) und Leukovorin verabreicht. Im Stadium III sollte Oxaliplatin hinzugefügt werden. Es werden verschiedene Schemata angewandt, die sich in Dosierung, Infusionszeit und Applikationsform unterscheiden. Üblicherweise wird die Chemotherapie alle 14 Tage in bis zu zwölf Zyklen verabreicht.

Beim Rektumkarzinom des mittleren und unteren Drittels im Stadium II und III wird zusätzlich eine neoadjuvante Radiochemotherapie empfohlen. Nach Sauer et al. (2004) zeigt sie eine geringere Toxizität und ermöglicht eine bessere lokale Kontrolle als die alleinige adjuvante Therapie. Außerdem erhöht sie die Anzahl an sphinktererhaltenden Operationen. (Sauer et al. 2004) Die neoadjuvante Therapie besteht entweder aus einer Kurzzeitbestrahlung oder der fraktionierten Bestrahlung mit kombinierter Gabe von Capecitabine oder 5-FU und Oxaliplatin. Kürzlich konnte herausgefunden werden, dass eine Kombination aus Radiochemotherapie (RCT) und folgender Chemotherapie vor der Operation die Erfolgsrate bei lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen deutlich steigern konnte. Dieser Therapieansatz wird als totale neoadjuvante Therapie (TNT) bezeichnet und umfasst eine zusätzliche Chemotherapie in voller Dosis, wie sonst als adjuvante Gabe üblich ist mit Folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin (FOLFOX) nach der neoadjuvanten RCT oder Folinsäure, 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin (FOLFIRINOX) vor der neoadjuvanten RCT. (Conroy et al. 2020; Fokas et al. 2019)

Bei hepatisch, pulmonal oder auch peritoneal metastasierten KKK sollte, wenn möglich, eine chirurgische Entfernung der Metastasen angestrebt werden. Bei primär nicht resektabler Metastasierung ist die Therapie generell individuell nach der Fitness des Patienten zu entscheiden und daher sehr komplex. (Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019) Ansatzpunkte sind Chemotherapeutika, wie sie größtenteils auch in der adjuvanten Therapie angewandt werden. Kombinationen aus Folinsäure, 5-FU und Oxaliplatin oder Irinotecan wurden in diversen Studien untersucht und steigern signifikant die Ansprechraten, das Rezidiv-freie-Überleben und die Fünf-Jahres Überlebensrate. (Gustavsson et al. 2015; Meyerhardt and Mayer 2005; Wolpin and Mayer 2008)

Bei Metastasierung, definitionsgemäß ab Stadium IV, werden die therapeutischen Möglichkeiten durch Einsatz von Antikörpern ergänzt. Eines, der bisher zugelassenen Moleküle, ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor- (VEGF) Antikörper Bevacizumab, der in die Angiogenese eingreift. Der Ansatzpunkt der Anti-Angiogenese soll im Verlauf dieser Arbeit näher erläutert werden. Darüber hinaus werden Antikörper gegen den epithelialen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), wie Cetuximab und Panitumumab eingesetzt. Mit Cetuximab konnten sogar Erfolge bei Irinotecan-resistenten Tumoren verzeichnet werden. (Cunningham et al. 2004) Entscheidend bei der Wahl des Antikörpers ist eine molekularpathologische Untersuchung auf

die Proto-Onkogen *rat sarcoma* (RAS)- und Onkogen *B-Raf* (*BRAF*)-Mutationen. Bei *RAS*-Wildtyp ist eine Therapie mit EGFR möglich. Bei *RAS*-Mutation und/ oder *BRAF*-Mutation wird die Therapie mit VEGF-Inhibitoren bevorzugt und eine Chemotherapie mit drei verschiedenen Chemotherapeutika empfohlen Folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan (FOLFOXIRI). (Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019) Eine Übersicht der stadienabhängigen Therapiekonzepte ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Für detailliertere Therapieschemata soll an dieser Stelle aufgrund der Komplexität jedoch auf die aktuelle S3-Leitlinie verwiesen werden. (Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019; Gustavsson et al. 2015; Meyerhardt and Mayer 2005; Wolpin and Mayer 2008)

Die meisten KRK werden erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und zeigen trotz der beschriebenen etablierten Therapien mit Chemotherapeutika und Bestrahlung eine schlechte Prognose. Eine wichtige Rolle spielen dabei Therapieresistenzen. Daher ist es notwendig weitere Behandlungsansätze zu finden. Einen potenziellen Angriffspunkt stellt dabei die Inhibition des glykolytischen Enzyms PFKFB3 dar, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen werden soll und welche von besonderem Interesse für die hier durchgeführten Untersuchungen ist.

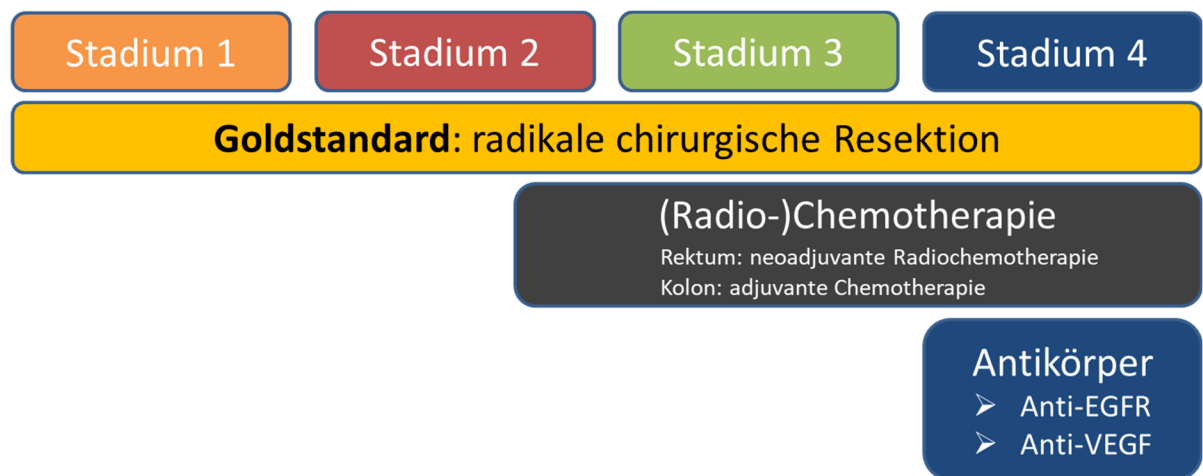


Abbildung 3: Stadienabhängige Therapiekonzepte Leitliniengerechte Therapiekonzepte in Abhängigkeit vom Diagnosestadium des Tumors, Abbildung basierend auf Leitlinienprogramm Onkologie (AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe) 2019

1.2 Glykolyse und PFKFB3

1.2.1 Rolle der Glykolyse und PFKFB3 in Tumor(endothel)zellen

Die Glykolyse ist ein streng durch viele Gene und Faktoren regulierter Stoffwechselweg. Studien konnten zeigen, dass eine gesteigerte Glukoseaufnahme mit einer schlechteren Prognose und einer höheren Aggressivität von Tumoren korreliert. (Kunkel et al. 2003; Yang et al. 2016) Otto Warburg fand bereits in den 1920er Jahren heraus, dass Tumorzellen und schnell proliferierende Zellen ihre Energie stärker über anaerobe Glykolyse mit anschließender Laktatausscheidung gewinnen als über den effizienteren Weg nach der Glykolyse die anfallenden Stoffwechselprodukte in den Zitratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung weiter zu verwerten. Seitdem beschäftigten sich viele Forscher damit, warum dies einen Vorteil für entartete Zellen darstellen könnte. Es gibt bislang mehrere Erklärungsansätze. So bietet der Energiegewinn über diesen Weg einen Wachstumsvorteil für entartete Zellen. Sie sind zeitweise Umgebungen mit wenig Sauerstoff und wenig Glukose ausgesetzt. Verschiedene Resistenzmechanismen erlauben ihnen, in dem bei diesem Prozess entstehenden laktatreichen, sauren Milieu zu überleben. Dies ist ein entscheidender Überlebensvorteil gegenüber normalen Zellen. (Gatenby and Gillies 2004) Solche Resistenzmechanismen sind teils assoziiert mit Mutationen im Ablauf der Adenom-Karzinom-Sequenz. Zum anderen sind sie aber auch unabhängig davon und die Expression der metabolischen Enzyme wird durch Hypoxie assoziierte Faktoren wie HIF1- α oder inflammatorische Moleküle wie Interleukin 6 (IL-6) gesteigert. (Chesney et al. 1999)

Zu einem der wichtigsten Enzyme, die somit vermehrt exprimiert werden, gehört die 6-Phosphofrukto-2-Kinase/2,6-Bisphosphatase, im Folgenden als PFKFB bezeichnet. Es ist ein bifunktionales Enzym, welches eine wichtige Rolle in der Regulation der Glykolyse übernimmt. Es kontrolliert das Level von Fruktose-2,6-Bisphosphat (F2,6BP), welches als allosterischer Aktivator von dem Schlüsselenzym Phosphofrukto-Kinase 1 (PFK-1) agiert und somit die Glykolyse antreibt. (van Schaftingen et al. 1981) Vier Isoformen von PFKFB sind bekannt. Alle bestehen aus einem N-Terminus mit Kinaseaktivität und einem C-Terminus, der die Phosphataseaktivität inne hat. (Ros and Schulze 2013) Die höchste Kinaseaktivität, mit einer Relation zur Phosphataseaktivität von etwa 710:1, lässt sich für PFKFB3 nachweisen, welches somit die wichtigste Rolle für die Glykolyse-Regulation zu spielen scheint. (Kim et al. 2006; Sakakibara et al. 1997) Abbildung 4 zeigt die Beteiligung von PFKFB3 und dem Isoenzym PFKFB4 in der Glykolyse und im Pentosephosphatweg schematisch. Durch alternatives Spleißen existieren sechs verschiedene Transkripte von PFKFB3. Eines davon ist in soliden

Tumoren, bei Hypoxie oder in inflammatorischen Bereichen besonders erhöht und wird daher als die induzierbare Form bezeichnet. Sie ist charakterisiert durch eine AUUUC-reiche 3'-untranslatierte Region. (Atsumi et al. 2002) Viele weitere Regulatoren und Stimuli von PFKFB3 sind mittlerweile bekannt. Dazu gehören vor allem der in Hypoxie erhöhte Faktor HIF-1- α oder die Mutation im Gen PTEN und P53. (Cordero-Espinoza and Hagen 2013) PFKFB3 wird außerdem posttranslational modifiziert, indem es von Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase (AMPK), Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert wird und dadurch die Kinaseaktivität zusätzlich gesteigert wird. (Ros and Schulze 2013) Eine erhöhte Phosphorylierungsrate lässt sich nach Gabe von Cisplatin verzeichnen. (Li et al. 2018) Nach Chemotherapie mit Oxaliplatin war PFKFB3 nachweislich erhöht exprimiert. (Yan et al. 2019) PFKFB3 steht also in Interaktion mit anderen bereits bekannten Therapeutika.

Mit aerober Glykolyse wird weniger Adenosintriphosphat (ATP) (4 Moleküle) hergestellt als über die oxidative Phosphorylierung (38 Moleküle). Allerdings steht es schneller zur Verfügung, was in Zeiten von hoher Proliferation ein wichtiger Faktor ist. Außerdem ist der Umschwung zum Pentosephosphatweg gegeben, in dem wichtige Metabolite für die Biosynthese produziert werden, sodass eine Zellproliferation erst möglich wird. (Lu et al. 2017; Chesney et al. 1999). Diese Erklärung wird durch die Erkenntnisse gestützt, dass PFKFB3 *in vivo* in soliden Tumoren vermehrt exprimiert wird, insbesondere in der S-Phase des Zellzyklus. (Atsumi et al. 2002)

Yalcin et al. (2009) konnten weiterhin herausfinden, dass eine bestimmte Spleißvariante im C-Terminus die Lokalisierung in den Nukleus veranlasst. Dort führt PFKFB3 zur Erhöhung des F-2,6BP-Spiegels und im Folgenden der Zyklin abhängigen Kinase 1 (CDK1), welches eine Stimulation der Proliferation verursacht, ohne die Glykolyse zu beeinflussen. (Sherr and Roberts 1995)

Jüngste Erkenntnisse belegen eine Beteiligung von PFKFB3 an der homologen Rekombination, vermehrt nach ionisierender Strahlung. (Gustafsson et al. 2018) Zudem scheint PFKFB3 an dem Fanconi-Anämie-Pfad zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt zu sein, die durch Platinderivat-assoziierte *DNA-Crosslinks* entstanden sind. (Ninou et al. 2021) Insbesondere dies und auch die vorher genannten Punkte machen PFKFB3 zu einem interessanten Ziel der anti-tumor Therapie vor allem in Bezug auf Radio- und Chemosensibilisierung.

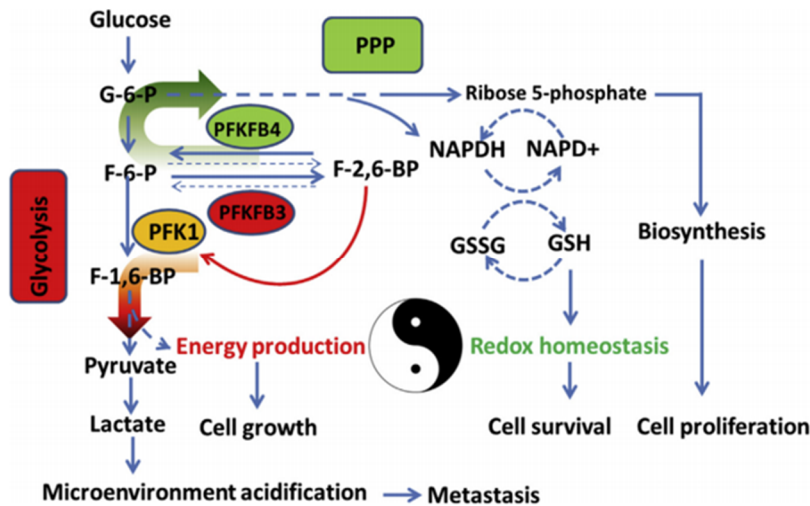


Abbildung 4: Die Rolle von PFKFB3 und PFKFB4 in der Glykolyse und im Pentosephosphatweg Die Regulation der Glykolyse und des Pentosephosphatweges (PPP) in Krebszellen durch PFKFB3 und PFKFB4 beeinflusst Zellproliferation, Zellüberleben, Zellwachstum und Tumorzellumgebung, Abbildung (PFKFB3 and PFKFB4 coordinate glycolysis and the PPP in cancer cells.) übernommen aus Yi et al. (2019) ©, keine Veränderungen vorgenommen, Lizenz: BY-NC-ND.

1.2.2 Die Rolle der Glykolyse und PFKFB3 bei der Tumorvaskularisierung

Um trotz sauerstoffarmer Umgebung ausreichend Energie zur Verfügung zu haben, betreiben Tumore Glykolyse. Doch auch dafür ist die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff als Stoffwechselressourcen notwendig. Tumoren nutzen verschiedene Mechanismen, um die Tumorvaskularisierung zu gewährleisten. So können sie bereits bestehende Gefäße nutzen oder sie spalten ein bestehendes Gefäß in zwei. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Betreiben von Vaskulogenese, wobei sie ganz neue Gefäße über Rekrutierung von Endothelzellen (EC) aus dem Knochenmark bilden. Bei der Angiogenese, einer vierten Option, lassen sie neuen Gefäße aus bereits existierenden aussprossen. (Dudley 2012) Der wohl bekannteste Regulator der Angiogenese ist der Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF). Dieser ist in aktivierten Endothelzellen (EC), so wie in Tumorzellen (TC) überexprimiert und stimuliert die Proliferation von EC, erhöht deren Überlebenszeit, steigert das Vorkommen von Adhäsionsmolekülen und die Permeabilität der gebildeten Gefäße. (Dudley 2012)

Durch die erhöhte Proliferation kommt es zu einem schnellen Ausbilden strukturell und funktionell abnormaler Tumorgefäße, wie in Abbildung 5 zu erkennen ist. Die Gefäße sind ungeordnet, vermehrt durchlässig, dilatiert und charakterisiert durch mangelhafte Zell-Zell-Kontakte. Ebenso sind die Gefäße nur von wenigen Perizyten umgeben, die sich schwach an

das Endothel anheften. (Cantelmo et al. 2017) Die Basalmembran ist unregelmäßig dick oder zum Teil gänzlich fehlend. (Jain 2005)

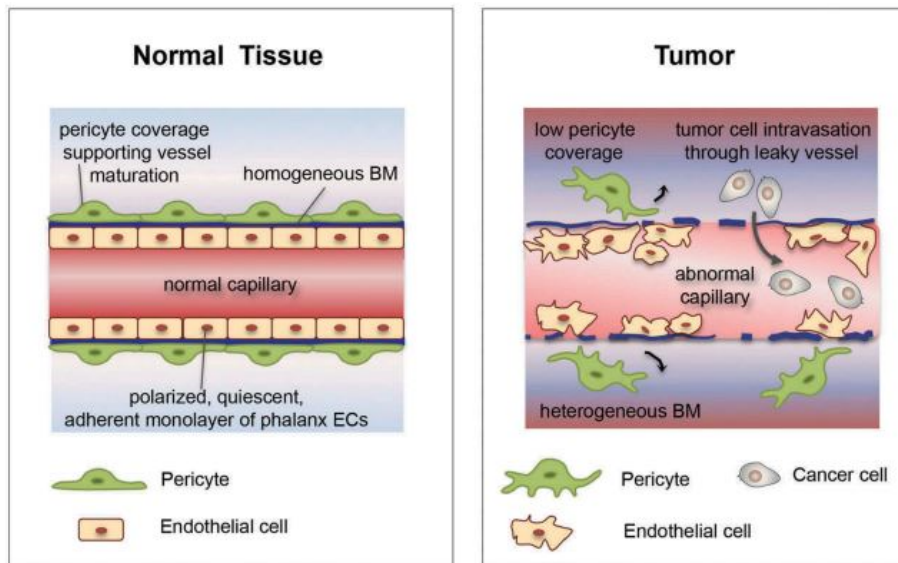


Abbildung 5: Tumorgefäße sind strukturell und funktionell abnormal Darstellung der Gefäße in normalem Gewebe mit intakter Barriere aus ummantelnden Perizyten, adhärenenten Endothelzellen und homogener Basalmembran im Vergleich zu Gefäßen in Tumoren mit gestörter Barriere durch mangelhafte Perizytenummantelung, non-adhärenenten abnormalen Endothelzellen und heterogener Basalmembran. Durch die lückenhaften Tumorgefäße wird eine Tumorzellinvasion erleichtert, Abbildung übernommen aus Cantelmo et al. (2017), keine Veränderungen vorgenommen, Lizenz: CC-BY

Dieser chaotische Aufbau sorgt für Instabilität und führt zu einer heterogenen Tumorumgebung. Die Gefäße werden leicht durch TC oder Stromazellen abgedrückt und zusammen mit den Undichtigkeiten resultiert ein ungleichmäßiger Blutfluss, mit zeitweise nicht ausreichender Versorgung mit Sauerstoff und Glukose, was die Ausbildung von Resistenzmechanismen und Metastasierung fördern kann. (Jain 2014; Bock et al. 2011)

Mit einer anti-angiogenen Therapie können, je nach Dosierung, zwei verschiedene Ziele verfolgt werden. Zum einen führt eine hohe Dosierung zur Regression von Tumorgefäßen, die somit im Sistieren des Tumorwachstums und Apoptose der TC resultiert. Diese Auswirkungen sind auch bei normalen Zellen zu sehen. Es konnte bereits beobachtet werden, dass Tumore Resistenzmechanismen entwickeln und der beschriebene Effekt zeitlich begrenzt ist, was erneut verdeutlicht, wie wichtig es ist, diese erfolgsversprechenden Ansatzpunkte weiter zu erforschen. (Haibe et al. 2020) Zum anderen kann durch eine niedrigere Dosierung eine Gefäßnormalisierung erreicht werden, die die Perfusion des Tumors verbessert, die Gefäße stabilisiert und verdichtet. (Cantelmo et al. 2016; Conradi et al. 2017) Bedenken, dass eine Minde-

Die Hypoxie, die das Tumorwachstum anregen würde, kann durch folgende Erklärungen begegnet werden: Durch milde Inhibition der Angiogenese können keine neuen Gefäße ausgebildet werden, sodass sich der Tumor zunächst nicht vergrößern wird. Eine verbesserte Blutversorgung gewährleistet auch ein erhöhtes und sicheres Ankommen von Chemotherapeutika. Eine verbesserte Sauerstoffversorgung führt zu einer schnelleren Proliferation der Zellen, die dadurch radiosensitiver werden. Hypoxie fördert Krebsprogression, die somit verlangsamt würde. Da sowohl Tumorendothelzellen (TEC) als auch TC eine Überexpression an VEGF zeigen, bietet die Angiogenese-Inhibition gleich zwei Angriffspunkte gegen einen Tumor parallel, da TC auch direkt geschädigt werden. (Jain 2005)

Mit voranschreitender Progression exprimieren Tumore viele weitere Faktoren, die die Angiogenese beeinflussen. So zeigten Cantelmo et al. (2016) eine hohe glykolytische Aktivität der TEC und dass eine gesteigerte Glykolyse die Gefäßausprossung steuert. Beides ist charakterisiert durch eine vermehrte Expression von PFKFB3, Glucosetransporter 1 (GLUT1) und weitere Enzyme des Pentosephosphatweges oder der Nukleotidsynthese.

Die Rolle der PFKFB3-gesteuerten Glykolyse in der Gefäßausprossung und die bereits beschriebene erhöhte Expression in Tumorzellen selbst, machen PFKFB3 zu einem wichtigen potenziellen Angriffspunkt in der Anti-Tumorthherapie.

1.2.3 PFKFB3-Inhibitoren

1.2.3.1 3-PO und PFK-15

2008 gelangen es Clem et al. ein kleines Molekül zu konstruieren, welches als spezifischer Inhibitor von PFKFB3 wirksam ist. 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one, bekannt als 3-PO, konkurriert zum einen mit Fruktose-6-Phosphat (F-6-P) um die Bindung an PFKFB3, um so dessen Kinaseaktivität zu hemmen. Zum anderen zeigen Untersuchungen des *Lineweaver-Burke*-Diagramms auch bisher nicht erklärbare, nicht-kompetitive Hemmeigenschaften. (Clem et al. 2008)

Da sowohl TC als auch EC eine hohe glykolytische Aktivität aufweisen, beeinflusst 3-PO den Energiehaushalt beider Zellarten. (Cantelmo et al. 2016)

Weiterhin zielt 3-PO nicht nur auf einen direkten Tumorangriff, sondern scheint mit anderen Chemotherapeutika zu interagieren. Beispielsweise konnte durch den Einsatz von 3-PO in tumortragenden Mausmodellen mit *human epithelial growth factor 2* (HER2) positivem Mammakarzinom die Ansprechrate auf Chemotherapeutika signifikant gesteigert werden, obwohl die Tumore als Chemotherapie-resistent galten. (Lu et al. 2017; O'Neal et al. 2016)

Auch auf Immunzellen nimmt 3-PO Einfluss. Telang et al. (2012) konnten zeigen, dass die Inhibition von PFKFB3 mit 3-PO die T-Zell-Aktivierung *in vitro* und die T-Zell-abhängige Immunität *in vivo* senkt. Somit könnte der Einsatz von 3-PO die immunsuppressive Therapie verbessern.

Im Hinblick auf meine Arbeit werde ich mich im Folgenden auf die beiden erst genannten Aspekte konzentrieren.

Um die Funktion von 3-PO etwas genauer zu beleuchten, ist zu nennen, dass es die Glukoseaufnahme hemmt und die intrazelluläre Konzentration an F2,6BP, Laktat, ATP, Nicotinamidadeninucleotid (NAD)⁺, und NADH senkt. (Clem et al. 2008) Diese Moleküle sind essenziell für den Proliferationszyklus einer Zelle, sodass, als Folge einer Konzentrationsenkung, der Zellzyklus in der G2-Phase der Mitose in einen Arrest versetzt wird. (Clem et al. 2008) Hohe Dosen von 3-PO erhöhen den metastatischen Index und die Intravasation von TC. Es wird die Fähigkeit der TC gesenkt, ohne Kontakt zur Basalmembran zu überleben. (Conradi et al. 2017)

Conradi et al. (2017) zeigten *in vivo* an Mausmodellen, dass eine hohe Dosierung (70 mg/ kg) die Krebszellproliferation inhibiert, das Primärtumorwachstum reduziert und Auswirkungen auf die Tumorgefäße hat. Die Gefäße werden durchlässiger, kleiner, ihr Lumen enger und sie sind nicht mehr gut im Konvolut integriert. Das Wachstum der EC wird eingeschränkt und irregulär. Dies verstärkt die Hypoxie in den Tumoren. Nach Gabe von nur 25 mg/ kg ähneln die Gefäßstrukturen wieder denen im gesunden Gewebe. (Schoors et al. 2014; Bock et al. 2013b) Das Wachstum ist reversibel eingeschränkt, die Tumoren schärfer begrenzt und es werden weniger Metastasen nachgewiesen, ohne dass diese Dosis die TC selbst angreift. (siehe dazu auch Abbildung 6) In bestehenden Lebermetastasen konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. (Cantelmo et al. 2016; Conradi et al. 2017)

Bei genauerer Untersuchung der Gefäßstruktur konnte herausgefunden werden, dass die Gefäße besser ausreifen. Sie weisen eine stärkere vaskuläre Barriere auf. Das Lumen ist wieder größer und ermöglicht eine bessere Perfusion der Tumore. (Cantelmo et al. 2016) Die gesamte Angiogenese ist jedoch eingeschränkt und die Laktatspiegel reduziert. (Bock et al. 2013b) Hohe Dosen von 3-PO wirken sich also anders auf die Zellen aus als die Anwendung niedriger Dosen. Die normalisierten Gefäße mit verbesserter Tumorperfusion führten zu der These, dass nun eine verbesserte Versorgung mit Chemotherapeutika möglich ist. Dies konnte mit Cisplatin gezeigt werden. In Kombination mit vorheriger 3-PO-Applikation wird das Tumorstadium stärker eingedämmt und die Metastasenbildung deutlich reduziert, da die Tumorzellen die Gefäßbarriere schlechter passieren können. (Cantelmo et al. 2016) Die verursachten

DNA-Schäden können in reduzierter glykolytischer Aktivität nicht effektiv beseitigen werden. Die Zellen gehen in Apoptose. (Li et al. 2018)

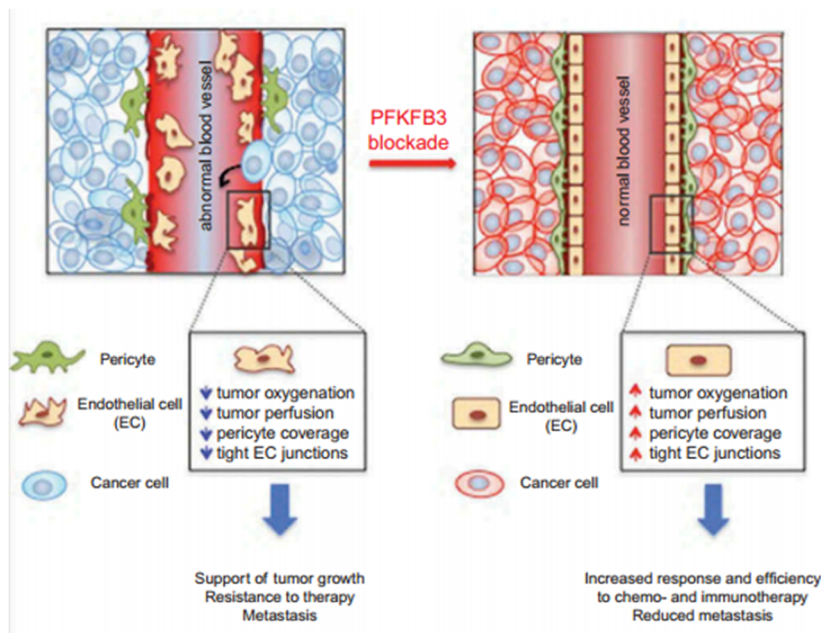


Abbildung 6: Tumorgefäßnormalisierung durch PFKFB3-Blockade Die Tumorgefäße sind charakterisiert durch einen Mangel an Perizyten und eine lückenhafte non-adhärenente Endothelzellschicht, was zu einer gestörten Barrierefunktion mit Erniedrigung der Oxygenierung und Perfusion führt und somit das Tumorstadium, Resistenzbildung und Metastasierung begünstigt. Beeinflussung des endothelialen Zellmetabolismus durch PFKFB3-Blockade führt zu Tumorgefäßnormalisierung mit verbesserter Perizytenbedeckung und Verfestigung der Endothelzellschicht. Die Tumoroxygenierung und Perfusion steigen, Chemo- und Immuntherapeutika erreichen effektiver den Tumor und durch verminderte Krebszellinvasion wird die Metastasierungstendenz reduziert, Abbildung übernommen aus Cantelmo et al. (2017), keine Veränderungen vorgenommen, Lizenz: CC-BY

Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit dem PFKFB3-Inhibitor 1-(4-pyridinyl)-3-(2-quinolinyl)-2-Propen-1-one (PFK-15) erzielt werden. Das Molekül ist ein Derivat von 3-PO, zeigt eine 100fach potentere Aktivität, verbesserte pharmakologische Eigenschaften, wie niedrigere Clearance, gesteigerte Halbwertszeit und verlängerte Mikrosomenstabilität. Ebenso wie 3-PO ist es spezifisch für PFKFB3. (Clem et al. 2013)

Auch die Effekte auf Tumorzellen sind ähnlich denen von 3-PO. In Zelllinien von Magenkarzinomen inhibiert PFK-15 die Proliferation, arretiert den Zellzyklus in der G0/G1-Phase, induziert Apoptose und reduziert die Invasivität der Tumorzellen. Bereits in murinen PDX-Modellen kann ein reduziertes Tumorgewicht weiterer Tumorarten ohne großen Effekt auf das Körpergewicht verzeichnet werden. (Zhu et al. 2016)

In Kombination mit Oxaliplatin kann eine Steigerung der Wirksamkeit erzielt werden. Die Inhibition von PFKFB3 mit PFK-15 scheint also einen synergistischen Effekt mit etablierter Chemotherapie zu haben, was PFK-15 zu einem interessanten Kombinationswirkstoff für zukünftige Therapien macht. (Clem et al. 2013) Um das Spektrum an Inhibitoren zu erweitern, ist das Interesse zur Entwicklung weiterer Moleküle groß. Eines davon ist KAN0438757, welches Hauptbestandteil unserer Untersuchungen ist und im Folgenden vorgestellt wird.

1.2.3.2 KAN0438757

KAN0438757 wurde 2018 von der schwedischen Firma Kancera entwickelt. (Olin 2019) Erste experimentelle Untersuchungen erfolgten durch Gustafsson et al. (2018).

Sie charakterisierten KAN0438757 als den Ester seines aktiven Metaboliten KAN0438241, welcher das Produkt einer Wirkstoffreihe nicht-kompetitiv bindender Phenylsulfonamidosalicylsäuren ist. Der Ester zeigt im Vergleich eine höhere Zellpermeabilität und eine effizientere intrazelluläre Hydrolyse zur Freisetzung seines aktiven Metaboliten.

KAN0438757 hemmt selektiv die Kinaseaktivität von PFKFB3. Die Analyse der Kristallstruktur von KAN0438757 zeigt, dass KAN0438757 die Substrattasche der katalytischen Domäne von PFKFB3 besetzt. Dies beweist die Bindung zur aktiven Seite des glykolytischen Enzyms. Dagegen hat KAN0438757 nur sehr geringe Auswirkungen auf nicht entartete Zellen. Diese haben aufgrund der nicht erhöhten Glykolyserate eine geringere Expression von PFKFB3 und sind somit weniger sensitiv gegenüber KAN0438757.

Eine signifikante Kreuzreaktivität ist im Bereich der IC_{50} von 0,19 – 3,6 μ M lediglich für PFKFB4 zu nennen, was bedeutet, dass KAN0438757 in diesem mittleren inhibitorischen Bereich spezifisch an PFKFB3 und wenig PFKFB4 bindet. Mögliche Inhibitionen anderer Enzyme oder Moleküle sind zu vernachlässigen. Effekte, die durch KAN0438757 erzielt werden, können somit sicher auf die Blockade von PFKFB3 und weniger auf PFKFB4 zurückgeführt werden. (Gustafsson et al. 2018)

Experimentelle Untersuchungen von KAN0438757 zeigten eine signifikante Suppression der intrazellulären Konzentration von F2,6-BP in Pankreas-, Magen- und Kolonkrebszellen. Nach Behandlung mit KAN0438757 war die Zellviabilität gesenkt. (Gustafsson et al. 2018) Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) und HCT-116 durch die Behandlung mit KAN0438757 auch weitere an der Glykolyse beteiligte Metabolite gesenkt wurden. Ebenso hatte die Behandlung Einfluss auf den zellulären Sauerstoffkonsum, der reduziert wurde. Weiterhin konnten wir kürzlich herausfinden, dass KAN0438757 die PFKFB3-*messenger ribonucleinacid* (mRNA)-Expression signifikant senken kann, sowohl in kolorektalen Tumorzelllinien als auch in Endothelzellen. Die Transkription blieb dabei jedoch

unbeeinflusst. (Oliveira et al. 2021) In Kombination mit Bestrahlung konnten Gustafsson et al. (2018) zeigen, dass die Zellen länger im G2/M-Phase-Arrest verharrten und die Aktivität der homologen Rekombination gesenkt wurde. Durch radioaktive Strahlung entstehen Doppelstrangbrüche in der DNA. Diese können entweder durch nicht-homologe Endverknüpfung repariert werden oder durch homologe Rekombination. Wie bereits in 1.2.1 erläutert, konnte für den zuletzt genannten Prozess gezeigt werden, dass PFKFB3 dort eine wichtige Rolle zu spielen scheint. PFKFB3 ist dabei Teil einer großen Kaskade und wird unter Strahlenexposition in den Nukleus lokalisiert. In mit KAN0438757 behandelten Zellen konnte gezeigt werden, dass diese Lokalisation in den Nukleus gesenkt wird. Ebenso war die Inkorporation aller vier Desoxytrinukleosidphosphaten um 50 – 75% reduziert, woraus eine Verlangsamung der Replikationsgeschwindigkeit resultierte. (Gustafsson et al. 2018) Doppelstrangbrüche konnten nicht effektiv repariert werden, KAN0438757 zeigt somit großes Potenzial als Radiosensibilisierer.

Die bei Behandlung mit Platinderivaten entstehenden *Crosslinks* zwischen den DNA-Strängen führen bei der Replikation zu Doppelstrangbrüchen. Der Fanconi-Anämie (FA)-Pfad spielt eine Rolle in der Reparatur dieser DNA-Schäden. Kürzlich konnten Ninou et al. (2021) zeigen, dass PFKFB3 an diesem Pfad entscheidend beteiligt ist. PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757 verhindert die Lokalisation in den Zellkern und das Binden von Schlüsselfaktoren des FA-Reparaturweges. Dies führt dazu, dass die Replikationsgabel nicht mehr gestartet werden kann, geschädigte Zellen können die Synthese-Phase zur Reparatur nicht mehr durchlaufen. Stattdessen werden Replikationsgabeln zum Kollaps gebracht und Doppelstrangbrüche häufen sich an. PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757 führt zu einer Chemosensibilisierung für Platinderivate auch bei bereits bestehenden Platinresistenzen. (Ninou et al. 2021)

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse und der der erzielten Wirkung mit 3-PO und PFK-15 kann ein Potenzial in der Chemosensibilisierung durch Tumorgefäßnormalisierung und direkten Einfluss auf Tumorzellen durch synergistische Effekte mit Chemotherapie erwartet werden.

1.3 Ziel der Dissertation

KAN0438757 zeigt sich durch bisherige Erkenntnisse als ein sehr interessanter neuer Inhibitor von PFKFB3 mit radiosensibilisierenden Eigenschaften durch die Beeinflussung der homologen Rekombination. Basierend auf dem Wissen der Auswirkungen von 3-PO und PFK-15, erwarten wir weiterhin Chemotherapie-sensibilisierende Eigenschaften von

KAN0438757 durch Tumorgefäßnormalisierung und synergistische Effekte mit Chemotherapeutika. Ziel dieser Arbeit soll daher sein, den Effekt von KAN0438757 genauer *in vitro* an kolorektalen Tumorzelllinien und Endothelzellen zu charakterisieren und seine Wirkung auf Tumorendothelzellen, Tumorgefäßentwicklung und Tumorzellen *in vivo* zu untersuchen.

Für die *In-vivo*-Charakterisierung soll zunächst evaluiert werden, wie sicher der Einsatz von KAN0438757 in Lebewesen ist. Im Folgenden soll die Effektivität auf die Ausbildung von Tumorblutgefäßen untersucht werden und ob das Tumorstadium möglicherweise auch direkt beeinflusst werden kann. Diese Untersuchungen sollen ebenfalls in Kombination mit üblicher Chemotherapie erfolgen.

In der Zellkultur sollen mit Hilfe von zellbasierten Assays Effekte von verschiedenen Konzentrationen von KAN0438757 auf die Morphologie, Zellviabilität, Apoptoserate und Migrations- und Invasionsfähigkeiten der Zellen untersucht werden. Die Effekte sollen weiterhin in Kombination mit Chemotherapie (Oxaliplatin) evaluiert werden. Basierend auf den Ergebnissen der *In-vitro*-Charakterisierung, sollen Experimente *in vivo* durchgeführt werden. Dafür sollen zunächst tumorfreie Mäuse (C57BL/6) mit verschiedenen Konzentrationen KAN0438757 behandelt werden, um Auswirkungen auf den Organismus und seine Toxizität zu evaluieren. Im Besonderen soll dabei auf das Wohlbefinden der Tiere geachtet werden und eine Analyse der Blutlaborparameter, Leberenzyme (AST, ALT, γ -GT, Laktat), Nierenwerte (Kreatinin) und eine histologische Untersuchung der Organe erfolgen. Diese Ergebnisse sollen genutzt werden, um eine geeignete Dosierung für KAN0438757 festzulegen. Schließlich sollen PDX-Modelle (Mäuse der Sorte *Not-obese diabetic-severe combined immunodeficiency* (NOD-SCID)) von kolorektalen Karzinomen generiert werden, um die Auswirkungen von KAN0438757 auf die Tumorendothelzellen und Tumorgefäßentwicklung, als auch in Kombination mit Chemotherapie, zu untersuchen.

Mit dieser Arbeit wollen wir die folgenden fünf Fragestellungen und Hypothesen beantworten bzw. belegen oder widerlegen.

Tabelle 2: Ziele der Dissertation - Fragestellung und Hypothesen

Nummer	Fragestellung/ Hypothese
1.	Welchen Effekt zeigt KAN0438757 <i>in vitro</i> auf Zellproliferation, Migration und Invasion?
2.	Welche Toxizität zeigt KAN0438757 <i>in vivo</i> und welche Dosis können wir zu therapeutischen Zwecken nutzen?
3.	KAN0438757 nimmt in niedriger Dosierung allein keinen Einfluss auf das Tumolvolumen.
4.	KAN0438757 führt in niedriger Dosierung zu Tumorgefäßnormalisierung, die eine Chemosensibilisierung zur Folge hat.
5.	Zeigt KAN0438757 synergistische Effekte mit Chemotherapie?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Herkunft
Adhäsive Objektträger Starfrost	Engelbrecht Medizin & Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Auslaufpipetten, serologisch (5, 10, 25 und 50 ml)	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
AutoClip® System Wundklammern, 9mm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser	Engelbrecht Medizin & Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Eindeckmittel Vitro Clud	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Einmalkanülen, Sterican®, 26G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmal-Skalpelle Präzisa	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, Deutschland
Einmalspritzen, Injekt®-F, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Insulinspritzen, BD Micro-Fine 0,5 ml	Becton, Dickinsons and Company, Franklin Lakes, USA
Kryoröhrchen 2,0 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kryoröhrchen 1,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Mikrotomklingen Feather	Pfm, Köln, Deutschland

Pasteurpipetten, Glas	Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen, Deutschland
Pipettenspitzen, Kombitips plus 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, RPT-Filter Tip One®	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, Tip One®	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, Tip One®, steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Platten - schwarz, 96-Well, Corning®	Corning, Inc, Croning, USA
Platten 12-Well Cyto One®	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Platten, 96-Well, Corning®	Corning, Inc, Croning, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml) RNA-se/DNAse frei, <i>biosphere safeseal tube</i>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml) RNA-se/DNAse frei, <i>biosphere safeseal tube</i>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (2 ml, 5 ml)	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Röhrchen, Falcon Tube (15 und 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Skalpell, <i>feather disposable scalpell</i>	Pfm, Köln, Deutschland
Zellkultureinsätze, ibidi®	ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
Zellkulturflaschen Cyto One® (75 und 225 cm ²)	STARLAB GmbH, Hamburg Deutschland
Zellkulturschale	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.1.2 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Geräte	Herkunft
<i>Architect plus C16000 analyzer</i>	Abbott, Green Oaks, USA
AutoClip® System Applikator, 9mm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
AutoClip® System Entferner	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bestrahlungsgerät, RS 225 <i>x-ray research</i>	Gulmay Medical Systems, Xstrahl Ltd, Camber-

<i>system</i>	ley, UK
<i>CELL DYN sapphire hematology analyzer</i>	Abbott, Green Oaks, USA
<i>dehydrator tissue processor ASP 300S</i>	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Einbettautomat Leica TP 1020	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC Professional	Vacu Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
<i>incubator C200, Inkubator CO2</i>	Labotect GmbH, Göttingen, Deutschland
Inkubator, Heraeus <i>function line</i>	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Kühl - Gefrierkombination Liebherr CP 3413	Liebherr-International GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Mehrkanalpipette Eppendorf Xplorer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop <i>axio imager</i>	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland
Mikroskop, Fluoreszenz, Leica CTB6500	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop, invers, Leica DM IL	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera, <i>high-speed</i> Leica EC3	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera AxioCam MRc	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland
Mikroskopkamera, Fluoreszenz, Leica DCF350 FX Camera	Leica, Wetzlar, Deutschland
Multipipette ® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipetten, Eppendorf <i>research plus</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer, accu-jet®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten Eppendorf <i>research pro</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage, ED224S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage, PL602-S	Mettler-Toledo, Inc., Columbus, USA
Schlittenmikrotom Microm HM 430	MICROM International, Walldorf, Deutschland
Sicherheitswerkbank, BDK-S	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Sterilbank, Biowizard Xline	Kojair, Vilppula, Finnland

Trockenschrank, Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Victor™ Multilabel Plate Reader	PerkinElmer, Inc., Waltham, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. Bohemia, USA
Wärmeplatte	Medax 1250 GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
Wärmeplatte	Medax & Nagel, Kiel, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	GFL mbH, 30938 Burgwedel, Deutschland
Wasserbad, Isotemp Model 2333	Fisher Scientific Laboratory Equipment, Marietta, USA
<i>water purification system, Milli-Q reference ultrapure</i>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
<i>xCELLigence real-time cell analysis (RTCA)</i>	ACEA Bioscience, San Diego, USA
Zählkammer, Neubauer <i>improved</i>	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge C-12000, mini	National Labnet CO, Woodbridge, USA
Zentrifuge, Allegra X30R	Beckman Coulter, Brea, USA

2.1.3 Zelllinien

Tabelle 5: Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HCT-116	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)
HT-29	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)
HUVEC	Dr. Argyris Papantonis, Klinik für Pathologie, UMG Göttingen, Deutschland Dr. Joanna Kalucka, Department of Biomedicine, Aarhus University, Dänemark

2.1.4 Zellkulturreagenzien

Tabelle 6: Zellkulturreagenzien

Zellkulturreagenzien	Herkunft
0,25 % Trypsin -EDTA	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA

Anti-Anti	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Aqua 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture</i> (DMEM/F-12) Inhalt 500 ml supplementiert mit: <ul style="list-style-type: none"> • Anti-Anti 1% (5 ml) • GlutaMAX 1% (5 ml) 	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Fetal Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
GlutaMAX	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Kryokonserviermedium für Zelllinien <ul style="list-style-type: none"> • FBS (90%) • Dimethylsulfoxid (DMSO) (10%) 	Eigens frisch hergestellt aus Einzelsubstanzen
Nährmedium, Endopan 300 SL Inhalt: Endopan 3 Kit (500 ml): <ul style="list-style-type: none"> • 2% FBS (10 ml) • Ascorbinsäure (0,5 ml) • Hydrocortison (0,1 ml) • R3-IGF-1 (0,5 ml) • VEGF (0,5 ml) • Heparin (0,5 ml) • <i>epithelial growth factor</i> (EGF) (0,5 ml) • <i>fibroblast growth factor</i> (FGF)-2 (0,5 ml) • Gentamicinsulfat / Amphotericin B (0,3 ml) 	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Nährmedium, McCoy's 5A	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA,

Inhalt 500 ml supplementiert mit: <ul style="list-style-type: none"> • 10% FBS (50 ml) • 1% Penicillin/ Streptocillin (Pen/ Strep) (5 ml) 	USA
Natriumchlorid 0,9% 100 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
NutriFreeze D10 Kryokonservierung Medium	Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel
Pen/ Strep	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
<i>phosphate-buffered saline</i> (PBS), pH 7,2	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
<i>Trypan Blue Solution</i> 0,4 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Reagenzien, Lösungen und Antikörper

Tabelle 7: Reagenzien, Lösungen, Antikörper

Reagenzien, Lösungen und Antikörper	Herkunft
<i>blocking reagent</i>	PerkinElmer, Inc., Waltham, USA
Bovines Serum Albumin (BSA) (Fraktion V)	MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland
Bromdesoxyuridin (BrdU) (Rb) AHP 2405	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
CaCl ₂	MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA
<i>Cluster of differentiation 31</i> (CD31), <i>purified rat anti-mouse</i> (Rt) 553370	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Diaminobenzidine (DAB)	ImmunoLogic, VWR Company, Amsterdam, Niederlande
<i>donkey anti-rabbit</i> Immunglobulin G (IgG) (H+L) <i>cross-adsorbed secondary antibody</i> , Biotin	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
<i>donkey anti-rat</i> IgG (H+L) <i>antibody</i> , Biotin <i>conjugate, highly cross-adsorbed</i>	novex by life technologies, Carlsbad, California, USA

<i>donkey serum</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
Eosin Y	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Ethanol 99%	Chemie Vertrieb, Hannover, Deutschland
Formalin 37%	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O ₂ -Hydrogen Peroxid 30%	MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxilin	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Hoechst 33342	Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen, Deutschland
<i>horseradish</i> Peroxidase Streptavidin	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Ki-67 Monoklonaler Antikörper (SP6) (Rb) MA5-14520	invitrogen, ThermoFisher Scientific, Inc, Waltham, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Electron Microscopy Science, Hatfield, USA
PFKFB3 (Rb) MA5-32766	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
<i>ProLong gold antifade mountant</i>	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Tris-Natriumchlorid-Block-Puffer (TNB)-Blocking Reagent	PerkinElmer, Inc., Waltham, USA
Tris-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA
Trypsin (T-7409 Sigma)	MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zitratpuffer (Zitronensäure-Monohydrat, Natriumzitrat-Dihydrat)	MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Kits

Tabelle 8: Kits

Kits	Herkunft
ALT: Aktivierte Aspartat Aminotransferase, ref. 8L92-21	Abbott, Green Oaks, USA
AST: Aktivierte Alanin Aminotransferase, ref. 8L91-21	Abbott, Green Oaks, USA
<i>Cytotoxicity Detection KitPLUS (Laktatdehydrogenase (LDH))</i> Inhalt: <ul style="list-style-type: none"> • Katalysator • Farbstoff-Lösung • Lyse-Lösung • Stopp-Lösung 	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
<i>Fluorometric Cell Viability Kit I</i> Inhalt: <ul style="list-style-type: none"> • Resazurin Lösung 	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
GGT: Total Bilirubin, ref. 7P32-21	Abbott, Green Oaks, USA
<i>Hypoxyprobe™ Plus Kit HPI Part # HP2-XXX</i> Inhalt: <ul style="list-style-type: none"> • <i>solid pimonidazole HCl (Hypoxyprobe™-1)</i> • <i>fluoresceinisothiocyanat (FITC) conjugated to anti-pimonidazole mouse IgG1 monoclonal antibody (FITC-MAb1)</i> • <i>rabbit anti-FITC conjugated with horseradish peroxidase as a secondary reagent</i> 	hpi, Inc, Burlington, USA
Kreatinin: PAP FS DiaSys Diagnostic Systems	Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland
Laktat: <i>DiaSys Diagnostic Systems</i>	Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland
<i>TSA Plus Multi-Fluorophore Detection Kit</i> (Cytine 3/ 5 System)	PerkinElmer, Inc., Waltham, USA

2.1.7 Tiere

Tabelle 9: Tiere

Tiere	Spalte1
C57BL6/N	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
NOD-SCID ^{Prkdc}	Erworben von Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich, weiter Expansion der Kolonie in ENI (European Neuroscience Institute), Göttingen, Deutschland

2.1.8 Medikamente

Tabelle 10: Medikamente

Medikamente:	Herkunft
Bepanthen®	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Caprieve® 50mg/ ml	Norbrook Laboratories Limited, Newry, Vereinigtes Königreich
Isofluran CP® 1 ml/ ml	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Revertor® 5mg/ ml	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Sevofluran	Abbott, Green Oaks, USA
Urostamin ® 100mg/ ml	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Xylariem® 20mg	ECUPHAR GmbH, Greifswald, Deutschland

2.1.9 Wirkstoffe

Tabelle 11: Wirkstoffe

Wirkstoffe	Herkunft
3-PO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
5-FU	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
KAN0438757	Institut für organische und biomolekulare Chemie (Prof. Ackermann), Göttingen, Deutschland
Oxaliplatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.10 Computerprogramme und Softwares

Tabelle 12: Computerprogramme und Softwares

Software	Herkunft
Citavi 6 (Version 6.8)	Swiss Academic Software GmbH
<i>GraphPad Prism 9.1.2 (226)</i>	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA
<i>ImageJ 1.43u Software</i>	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. (https://imagej.nih.gov/ij/ , 1997–2016)
Leica Image Manager 50 (IM50)	Leica, Wetzlar, Deutschland
<i>Microsoft Office 365 2019 (Word, Excel, Power Point)</i>	
<i>RTCA Software Lite version 1.2</i>	ACEA Bioscience, San Diego, USA
Tierbase	
<i>Viktor X4 Multilabel Plate Reader PerkinElmer 2030 Software Version 4.00</i>	PerkinElmer, Inc., Waltham, USA
<i>ZEN lite 2011 von Zeiss</i>	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 *In-vitro*-Experimente

2.2.1.1 Zellkultivierung

Es wurden die humanen kolorektalen Tumorzelllinien HCT-116 und HT-29 von der American Type Culture Collection und aus der Nabelschnur gewonnene humane Endothelzellen, im Folgenden HUVEC genannt, verwendet, die uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden von Dr. Argyris Papanonis (Klinik für Pathologie, UMG) und Dr. Joanna Kalucka, (Department of Biomedicine, Aarhus University, Dänemark). Alle Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen bei atmosphärischer, angefeuchteter Luft bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Für die Zelllinien HCT-116 und HT-29 wurde das Medium McCoy's 5A supplementiert mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet und für die HUVECs das Medium Endopan 3 Kit/Endopan 300SL.

Für Experimente wurden Tumorzellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase in den Passagen fünf bis zwölf und Endothelzellen in den Passagen drei bis zwölf genutzt.

Die maximale DMSO-Konzentration zur Behandlung der Zellen war $\leq 0,25\%$.

2.2.1.2 Mediumwechsel und Zellsplittung

Ein Mediumwechsel wurde regelmäßig alle zwei bis drei Tage durchgeführt, um tote Zellen und angefallene Zellabfallprodukte zu entfernen und den Zellen nötige Nährstoffe zukommen zu lassen.

Wenn die Zellen mehr als 95% konfluent waren, wurden sie in eine neue Flasche überführt und dabei verdünnt. Diesen Vorgang bezeichnet man als *splitting* oder Passagieren.

Dafür wurden die Zellen in der 125 ml Flasche zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und danach trypsiniert. Als nächstes wurden die schwimmenden Zellen mit 10 ml des jeweiligen Mediums resuspendiert, um das Trypsin zu neutralisieren, in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei maximal 500 g und 4°C für 5 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde aspiriert und das Zellpellet mit 1 ml des jeweiligen Mediums resuspendiert. Orientiert an der Zelldichte, der Verdopplungszeit und der benötigten Anzahl der Zellen wurde das Verhältnis des Passagierens gewählt, die jeweilige Menge in eine frische 125 ml Flasche passagiert und nach Zusatz von 12 ml des jeweiligen Mediums wieder inkubiert.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Für viele der im Folgenden beschriebenen Experimente wurde eine bestimmte Zellanzahl benötigt. Dafür wurden die Zellen in einer Neubauerkammer ausgezählt.

Zunächst wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt, um eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen treffen zu können. Als nächstes wurde eine Seite der Neubauerzählkammer mit der gefärbten Zellsuspension gefüllt. Alle vier Quadranten (A-D) wurden auf ungefärbte, also lebendige Zellen ausgezählt und die Zellzahl unter Berücksichtigung der Verdünnung mit 0,4% Trypanblau mit folgender Formel auf 1 ml berechnet.

$$\frac{(\text{Zellzahl A+B+C+D}) \times 2}{4} \times 10000 = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

2.2.1.4 Mikroskopie

Alle Zellen wurden mit dem Mikroskop invers, Leica DM IL (Leica AG, Wetzlar, Deutschland) betrachtet und die Fotos mit der Mikroskopkamera High-speed Leica EC3 (Leica, Wetzlar, Deutschland) in der Vergrößerung 4, 10, 20 oder 40x aufgenommen.

Die immunhistochemisch angefärbten Schnitte wurden mit dem Mikroskop Axio Imager (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland) begutachtet und Bilder mit der zugehörigen Mikroskopkamera (AxioCam MRc) in einer Vergrößerung von 5x, 10x oder 20x aufgenommen. Die immunfluoreszenzchemisch angefärbten Schnitte wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop

Leica CTB6500 und der Mikroskopkamera Leica DCF350 FX Camera betrachtet und bei einer Vergrößerung von 40x fotografiert.

Alle Aufnahmen wurden mit der jeweils zugehörigen Software (ZEN lite 2011 für AxioCam MRc, Leica IM50 für Leica DCF350 FX Camera) verarbeitet. Die Fotos wurden in einem *joint photographic experts group* (jpg)-Datenformat gespeichert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von ImageJ 1.43 u Software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2016).

2.2.1.5 Untersuchung der Morphologie

Um Effekte von KAN0438757 auf die Morphologie der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen nach Behandlung mit KAN0438757 beobachtet und die Zellmorphologie verglichen.

Zunächst wurden 8000 Zellen pro Well auf einer 12-Well-Platte in 1 ml des für die Zellen empfohlenen Mediums ausgesetzt. Die Platten wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, damit sich die Zellen an den Boden anheften konnten.

Vor Inhibitorzugabe wurde zur Stunde 0 ein Foto pro Kondition gemacht, welches schließlich als Vergleichskontrolle diente.

Das Medium wurde abgesaugt und 1 ml frisches Medium mit KAN0438757 in der jeweiligen Konzentration auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden weiterhin für 48 h inkubiert. Weitere Fotos wurden nach 6 h, 24 h und 48 h jeweils pro Konzentration gemacht, um Veränderungen der Zellmorphologie zu verfolgen und anschließend vergleichen zu können.

2.2.1.6 Invasions-Assay

Ein modifizierter Invasions-Assay wurde durchgeführt, wie bereits von Hagemann et al. (2004) beschrieben. Für die Vorbereitung des Invasions-Assays wurden zwei autoklavierte Glasplatten, eine Membran, eine autoklavierte Pasteurpipette und 200 µl extrazelluläre Matrix (ECM) aus dem Gefrierschrank benötigt. Weiterhin wurden 600 µl serumfreies Medium aus dem Kühlschrank, das empfohlene Medium für die verwendeten Zellen und die beiden Kammerhälften mit jeweils 14 Wells benötigt. Zunächst wurde die Membran auf eine Glasplatte gelegt, das serumfreie Medium und die ECM auf der Membran zügig verteilt und mit der Pasteurpipette ausgerollt. Während der Einwirkzeit von 10 min wurden die Wells der unteren Kammerhälfte mit dem jeweiligen Zellmedium, welches die Inhibitoren in den gewünschten Konzentrationen enthielt, befüllt, sodass ein konvexer Flüssigkeitsspiegel entstand. Dann wurde die mit ECM bedeckte Membran luftblasenfrei auf die untere Kammerhälfte gelegt. Ebenfalls luftblasenfrei wurde die obere Kammerhälfte auf die Membran gelegt und die beiden Kammerhälften von der Mitte aus fest verschraubt.

In die obere Kammerhälfte wurden 0,5 ml des jeweiligen Mediums gegeben und die Kammern für 30 min bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert, um die Membran zu equilibrieren.

Die obere Kammer wurde dann mit weiteren 0,5 ml von einer vorher vorbereiteten Zellsuspension befüllt. Diese enthielt 200.000 Zellen in 1 ml, sodass pro Well 100.000 in der Kammer enthalten waren. Anschließend wurde KAN0438757 in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben, sodass beide Hälften der Kammer dieselbe Konzentration enthielten. Nach 96 h Inkubation wurde das Experiment beendet. Dafür wurde das Medium mit den nicht-über die Membran transmigrierten Zellen der oberen Kammerhälfte verworfen und die Zellsuspension der unteren Kammerhälfte pro Kondition in ein Falcon überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei maximal 500 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand bis auf 1 ml verworfen. Das Pellet wurde mit dem zurückbleibenden Überstand von 1 ml resuspendiert, die Zellen mit 0,4% Trypanblau angefärbt und in einer Neubauerzählkammer pro Kondition ausgezählt.

2.2.1.7 xCELLigence

Um die Auswirkung von KAN0438757, insbesondere die Toxizität zu bestimmten Zeitpunkten, möglichst genau zu bestimmen, wurde eine Analyse der Zellen in Bezug auf Viabilität, Morphologie und Adhäsionsfähigkeit in Echtzeitmessung durchgeführt. Dafür wurde der xCELLigence RTCA von ACEA Bioscience verwendet.

Für die Messung wurden 16-Well-Platten vorbereitet. Diese sind am Boden mit goldenen Mikroelektroden beschichtet. Die Wells wurden zunächst mit 100 µl Medium befüllt, das für die verwendeten Zellen empfohlen ist. Um eine dauerhaft feuchte Kammer zu gewährleisten, wurden die Räume zwischen den Wells mit PBS aufgefüllt.

Für die Equilibrierung wurde die Platte im Gerät eingelesen und in der Software die Voreinstellungen (Zellart, Inhibitor mit Konzentration, Laufzeit (96 h), Abstände der Messwerterhebung (alle 5 min)) vorgenommen und die genauen Konditionen des geplanten Experiments definiert. Sobald die Wells mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllt und an ein elektrisches Potenzial angeschlossen werden, wandern Elektronen von der negativen Seite der Mikroelektroden zu der positiven Seite. (Türker Şener et al. 2017) Es entsteht eine Impedanz, die von der Maschine automatisch in Echtzeit gemessen wird. Wenn die Software beim ersten Einlesen keine Fehler verzeichnete, konnten die Platten entnommen und die Wells mit 100 µl Zellsuspension aufgefüllt werden (10.000 Zellen/ Well).

Die fertig vorbereiteten Platten wurden wieder in die Maschine eingelegt und die Messung unter Zellkulturbedingungen bei 5% CO₂ und 37°C begonnen. Diese Impedanz ändert sich, sobald Zellen in dem Medium enthalten sind. In Abhängigkeit von der Anzahl der Zellen,

ihrer Morphologie, der Zell-Substrat-Interaktion und Zelladhäsion wird anhand der Impedanzänderung von der Software automatisch ein einheitsloser Wert, genannt Zellindex, mit folgender Formel berechnet und dieser einheitslos in *arbitrary units* (A.U.) angegeben. (Türker Şener et al. 2017)

$$\text{Zellindex} = \frac{\text{Impedanz zum Zeitpunkt der Messung} - \text{Impedanz in Abwesenheit der Zellen}}{\text{nominaler Impedanzwert}}$$

Die Berechnung erfolgt in Echtzeit und wird von der Software zeitgleich in einen Graphen geplottet zur Ansicht gestellt.

Die Impedanz steigt an, wenn sich die Zellen über den Mikroelektroden positionieren und fokale Adhäsionen bilden. Besteht nach Zellzugabe noch keine 100%ige Konfluenz, proliferieren die Zellen und die Impedanz steigt weiter an, bis eine 100%ige Konfluenz erreicht wird und sich ein Plateau des Impedanzwertes einstellt.

Wenn Zellen in Apoptose gehen, sich ihre Morphologie ändert oder die Adhäsionsfähigkeit verloren geht, lässt sich ein Abfall der Impedanz verzeichnen, der auch einen Abfall des Zellindex erzeugt. (Türker Şener et al. 2017)

Nach 2 h wurde die Messung für kurze Zeit unterbrochen, um 1 µl des Inhibitors in der jeweilig vordefinierten Konzentration zu ergänzen. Dann wurde die Messung fortgesetzt. Nach 48 h wurde die Inhibitorzugabe nach demselben Schema wiederholt und die Messung erneut für 48 h fortgesetzt. Nach insgesamt 96 h beendete die Software automatisch die Messung.

2.2.1.8 Scratch-Assay/ Wundheilungs-Assay

Der Wundheilungs-Assay, auch Migrations-Assay oder *Scratch-Assay* genannt, stellt eine der ersten Methoden dar, um die direkte Migrationsfähigkeit und die Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten zu untersuchen. (Rodriguez et al. 2005) Er wurde durchgeführt, um die Effekte des Inhibitors KAN0438757 auf die Migrationsfähigkeit der Zellen zu analysieren. Für den Assay wurden *Culture-Insert-2- Wells* von ibidi® verwendet und diese in der Mitte jedes Wells einer 12-Well-Platte platziert.

Zur Vorbereitung des Wundheilungs-Assays wurden aus einer Zellsuspension jeweils 70 µl in jedes Well eines *Culture-Insert-2* pipettiert, sodass jedes Well etwa 30.000 Zellen enthielt. Die Zellen wurden für 24h bei 37°C und 5% CO₂ für etwa drei Tage inkubiert. Bei 100%iger Konfluenz der Zellfläche, wurden die Inserts vorsichtig entfernt. Dabei sollte die Zellfläche nicht beschädigt werden. Um tote Zellen und Zellabfall zu entfernen, wurden die Zellen mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und die Wells mit 1 ml frischem Medium befüllt. Je nach Ver-

suchskondition, wurde diesem Medium vorher eine bestimmte Menge an KAN0438757 beige-fügt.

Unter dem Mikroskop wurden in 10facher Vergrößerung Fotos nach 0 h, 6 h, 18 h, 24 h, 30 h, 42 h und 54 h (HCT-116, HT-29) und nach 3 h, 6 h, 9 h, und 12 h (HUVEC) gemacht. Zwischenzeitlich wurden die Zellen zurück in den Inkubator gestellt. Die Zellen an der Grenze zu der zellfreien Fläche sollten versuchen, sich zu dieser Fläche hinzubewegen, um sie zu schließen. Dies sollte von beiden Seiten durch Ausbildung neuer Zell-Zell-Kontakte geschehen. (Liang et al. 2007)

Je besser die Zellen migrierten und je eher sie Zell-Zell-Kontakte ausbildeten, desto schneller wurde die zellfreie Fläche geschlossen.

Es wurden drei Wiederholungen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Bilder wurden wie unter 2.2.1.4 und 2.3 beschrieben ausgewertet, indem die zellfreie-Fläche gemessen und in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt wurde.

2.2.1.9 LDH-Assay

Laktatdehydrogenase (LDH) ist in nahezu allen Zellen enthalten. Wenn die Zellmembran geschädigt wird oder wenn Zellen sterben, wird LDH aus dem Zellinneren freigesetzt. Die Menge kann anhand der LDH-Aktivität gemessen werden. Sie korreliert mit der Anzahl der zugrunde gegangenen Zellen und stellt somit einen verlässlichen Wert für die Bestimmung der Zytotoxizität eines Substrats und die Zytolyse dar. (Korzeniewski und Callewaert 1983)

Die LDH katalysiert den letzten Schritt der anaeroben Glykolyse. Sie reduziert Pyruvat zu Laktat und oxidiert dabei $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ . Dieser Schritt ist wichtig, um genügend NAD^+ für die Glykolyse bereit zu stellen, wenn den Zellen nicht ausreichend Sauerstoff für den Ablauf der aeroben Glykolyse zur Verfügung steht.



Für den Assay wurde das Zytotoxizitäts-Nachweis-Kit-Plus (LDH) von Roche® verwendet.

Da jeder Zelltyp eine unterschiedliche Menge an LDH besitzt, sollte zunächst für jede verwendete Zelllinie herausgefunden werden, welche die optimale Zellkonzentration für den Assay ist. Dafür wurde eine 96-Well-Platte mit 100 µl des für die jeweiligen Zellen empfohlenen Zellmediums befüllt. Danach wurden in sechs Wells jeweils 100 µl einer Zellsuspension gegeben und eine serielle Verdünnung in vier Stufen hergestellt (15.000, 7.500, 3.750 und 1.875 Zellen pro Well). Für eine verlässlichere Auswertung der Ergebnisse sollten für jede Kondition Triplikate durchgeführt werden. Drei Wells waren für die Niedrig-Kontrolle bestimmt, die die LDH-Aktivität in unbehandelten Zellen darstellte. Drei Wells waren für die Positiv-

Kontrolle bestimmt, welche die maximale LDH-Freisetzung nach Zellyse anzeigt. Drei weitere Wells blieben zellfrei, um die Hintergrundabsorption des jeweiligen Mediums zu detektieren.

Die Platte mit den Zellen wurde zunächst bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zeit sollte der Inkubationszeit des durchzuführenden Assays entsprechen (24 h oder 48 h).

Nach der Inkubationszeit wurden zu den Zellen der Hoch-Kontrolle jeweils 5 µl der Lyse-Lösung gegeben und diese inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden 100 µl der frisch hergestellten Reaktions-Lösung in jedes Well gegeben und lichtgeschützt bei 15-25°C für 5-10 min inkubiert. 50 µl einer Stop-Lösung beendeten die Reaktionen. Bei einer Wellenlänge von 490 nm wurde die Absorption gegen einen Referenzfilter mit 600 nm Wellenlänge in einem *Multilable Plate Reader (Viktor X4 Multilabel Plate Reader PerkinElmer 2030 Software Version 4.00)* gemessen.

Bei der Reaktion wird das gelbe Tetrazolium Salz Iodotetrazolium (INT) durch den Katalysator Diaphorase unter Verbrauch von NADH+H⁺ zu dem blauen Farbstoff Formazan umgewandelt. Die LDH stellt das benötigte NADH+H⁺ zur Verfügung, indem es Laktat zu Pyruvat oxidiert und dabei NAD⁺ zu NADH+H⁺ reduziert. Je höher die LDH-Aktivität ist, desto mehr NADH+H⁺ steht für die Umwandlung von Tetrazolium zu Formazan zur Verfügung, welches eine Absorption bei 490 nm aufweist. Die Absorption korreliert linear mit der LDH-Aktivität und somit auch mit der Menge an lysierten Zellen. (abcam 2019)

Die Absorption wurde in Abhängigkeit von der Zellzahl für beide Kontrollgruppen in einem Graphen aufgetragen. Als optimale Zellkonzentration wurde diese gewählt, bei der die größte Differenz zwischen der Niedrig- und Hoch-Kontrolle bestand.

Mit dem Wissen um die optimale Zellkonzentration für die jeweilige Zelllinie, konnten die Platten für die Messung des zytotoxischen Potenzials der Inhibitoren vorbereitet werden. Dafür wurde jedes Well einer frischen 96-Well-Platte mit der optimalen Zellzahl (7.500 für HCT-116 und HT-29 und 15.000 für HUVEC) in 100 µl Medium befüllt und für mindestens 12 h inkubiert (37°C, 5% CO₂). Im nächsten Schritt wurde das Medium aspiriert und 100 µl Medium mit der bestimmten Konzentration an Inhibitoren zu den Zellen gegeben. Für jede Konzentration wurden Triplikate an Wells vorbereitet. Die weiteren Schritte glichen der beschriebenen Zellzahlbestimmung.

Für die Berechnung der Zytotoxizität wurde der Durchschnitt der Absorption der Hintergrundkontrolle gebildet und von jedem weiteren gemessenen Wert subtrahiert. Von den jeweiligen Triplikaten wurde ebenfalls der Durchschnitt gebildet. Die Zytotoxizität berechnete sich wie folgt: (abcam 2019)

$$\text{Zytotoxizität(\%)} = \frac{\text{Absorption} - \text{Niedrig-Kontrolle}}{\text{Hoch-Kontrolle} - \text{Niedrig-Kontrolle}}$$

Der Assay wurde dreimal unter gleichen Bedingungen wiederholt. Die Ergebnisse wurden in *Graphpad Prism9* graphisch dargestellt.

Je höher die Absorption war, desto mehr Zellen wurden geschädigt oder getötet und desto höher war das zytotoxische Potenzial der Inhibitoren.

2.2.1.10 CellTiter-Blue®-Cell-Viability-Assay

Um die Viabilität der Zellen zu messen, wurde ein *CellTiter-Blue®-Cell-Viability-Assay* (CTB-Assay) durchgeführt und dafür das *Fluorometric-Cell-Viability-Kit I-Resazurin* von PromoCell verwendet. Der Assay basiert auf einer fluorometrischen Messung. Das Kit beinhaltet das Reagenz Resazurin, welches nach Zugabe zu den Zellen in diese penetriert. Viable Zellen reduzieren Resazurin zu Resorufin. Dieses wird wieder aus den Zellen entlassen. Die Reduktion ist ein metabolischer Prozess und wird von verschiedenen Enzymen katalysiert. Zellen, die nicht mehr viabel sind, haben diese Fähigkeit verloren.

Resazurin ist dunkelblau, zeigt ein Absorptionsmaximum bei 605 nm und wenig Fluoreszenz. Resorufin ist pink, ist hochfluoreszierend mit einem Exzitationsmaximum bei 579 nm und einem Emissionsmaximum bei 585 nm. Das Absorptionsmaximum von Resorufin liegt bei 573 nm.

Die Fluoreszenz steigt linear mit der Anzahl der vorhandenen viablen Zellen, sodass anhand der Fluoreszenzmessung auf die Anzahl viabler Zellen geschlossen werden kann. (Promega 2016; PromoKine 2019)

Resazurin ist generell nicht zelltoxisch. (Ahmed et al. 1994) Jedoch kann ab einer Inkubationszeit über 22 h ein Verlust, der eben beschriebenen Linearität beobachtet werden. Weitere Untersuchungen ergaben ebenfalls bei längerer Inkubation einen Einfluss auf das Zellwachstum viabler Zellen (Gloeckner et al. 2001), sodass der Assay als Endpunktmessung zu betrachten ist.

Für die Durchführung wurden zunächst 10.000 Zellen für HCT-116 und HT-29 und 15.000 Zellen für HUVEC in 100 µl des, für die jeweiligen Zellen empfohlenen, Mediums vorbereitet und in eine *opaque-walled*-Gewebe-Kultur-Platte mit 96-Wells pipettiert und für mindestens 12 h inkubiert (37°C, 5% CO₂), damit sich die Zellen am Boden anheften können. Im nächsten Schritt wurde das Medium abgesaugt und 100 µl zellfreies Medium mit der bestimmten Konzentration an KAN0438757 zu den Zellen gegeben. Für jede Konzentration wurden Triplikate vorbereitet und zusätzlich drei Wells für Kontrollgruppen: Kontrolle für die Hinter-

grundfluoreszenz durch das Medium und Resazurin (zellfrei, nur Medium), eine Niedrig-Kontrolle (Medium und unbehandelte Zellen). Die Zellen wurden für weitere 48 h inkubiert. Bereits nach 47 h Inkubation wurden die Zellen kurzzeitig aus dem Brutschrank genommen, in jedes Well 10 µl Resazurin pipettiert und diese wieder für weitere 60 min inkubiert. Die Inkubation kann je nach Zelllinie und Experiment verlängert werden.

Nach 60 min Inkubation wurde die Fluoreszenz in einem *Multilabel Plate Reader (Viktor X4 Multilabel Plate Reader* PerkinElmer 2030 Software Version 4.00) bei 560_{ex}/590_{em} nm gemessen.

Für die Berechnung der Fluoreszenzen wurde der Mittelwert der Hintergrundfluoreszenz gebildet und von jedem gemessenen Wert subtrahiert. Der Assay wurde dreimal unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit *GraphPadPrism9* graphisch dargestellt. Je niedriger die gemessene Fluoreszenz war, desto mehr Zellen waren nicht mehr viabel und desto toxischer war der Einfluss der Inhibitoren.

2.2.2 *In-vivo*-Experimente

2.2.2.1 Tierhaltung

Es wurden Mäuse der Linie C57BL6/N aus dem *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA) und NOD-SCID^{Prkdc} (Janvier LAB, Frankreich, Expansion dieser in ENI, Göttingen, Deutschland) verwendet.

Alle Prozeduren wurden von dem niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt: Tierversuchsantrag (TVA) 33.9-45502-04-20/3490, TVA 33.19-42502-04-21/3816 und TVA 33.19-42502-04-17/2407.

Zur Verwendung der humanen Gewebe wurde von allen Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt (Antragsnummer 25/3/17, aus 2017).

Die Tiere wurden im Tierstall der UMG in einem 12-Stunden Hell/Dunkel-Zyklus gehalten. Aufgrund der stark eingeschränkten Immunabwehr der NOD-SCID^{Prkdc}, wurden diese in einem separaten Raum unter Pathogen-freien Hygienestandards in *individual ventilated cages* (IVC) Käfigen gehalten. Das Betreten des Raumes war nur mit Tragen einer vollständigen Schutzkleidung gestattet. Diese umfasste neben Kittel und Handschuhen zusätzlich Haarschutz, Mundschutz und einen Schuhwechsel.

Neben der täglichen Pflege und Versorgung mit Wasser, Futter und Spielmaterial, wurden die Mäuse täglich visitiert. Dabei wurde speziell auf Wohlbefinden und Wundheilung geachtet. Die Gewichtsmessung erfolgte einmal pro Woche, die Tumorvermessung dreimal pro Woche mit einer Schieblehre.

2.2.2.2 Dosistestung von KAN0438757

KAN0438757 wurde als Radiosensibilisierer entdeckt und bereits an verschiedenen Zelllinien getestet. (Gustafsson et al. 2018) Die Wirkung *in vivo* wurde bisher nicht evaluiert. Bevor also die Wirksamkeit auf Tumore in Lebewesen untersucht wird, sollte eine Testung der Verträglichkeit erfolgen und kurzfristige Nebenwirkungen der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen aufgedeckt werden. Dafür wurden 21 tumorfreie, unbehandelte männliche, neun Wochen alte Mäuse der Linie C57BL6/N verwendet. Diese wurden in sieben Behandlungsgruppen á drei Mäuse eingeteilt. Das Therapieschema kann

Abbildung 7 entnommen werden. Drei Behandlungsgruppen wurden einmalig über 24h behandelt. Zwölf weitere Mäuse wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen behandelt. Für die Behandlung wurde der Inhibitor in 100% DMSO gelöst und langsam mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine 50%ige DMSO Konzentration verdünnt. Gewichtsadaptiert wurden an jedem Behandlungstag Volumina zwischen 70 µl und 100 µl injiziert. Die maximal applizierte Menge an DMSO betrug also 50% der injizierten Menge. 24 h nach der letzten Behandlung wurden alle Mäuse euthanasiert. 500-600 ml Blut wurden per kardialer Punktion entnommen. Die Analyse des Blutbildes erfolgte mit dem CELL DYN *Sapphire Hematology Analyzer*. Die Blutparameter AST, ALT, GGT, Kreatinin und Laktat wurden unter Verwendung verschiedener Kits mit dem *Architect Plus C16000 Analyzer* bestimmt. Die Kits sind der Tabelle in Kapitel 0 zu entnehmen. Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas, beide Nieren und das Intestinum wurden vorsichtig herauspräpariert und in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit H&E gefärbt und anschließend mikroskopisch beurteilt in Hinblick auf histopathologische Auffälligkeiten.

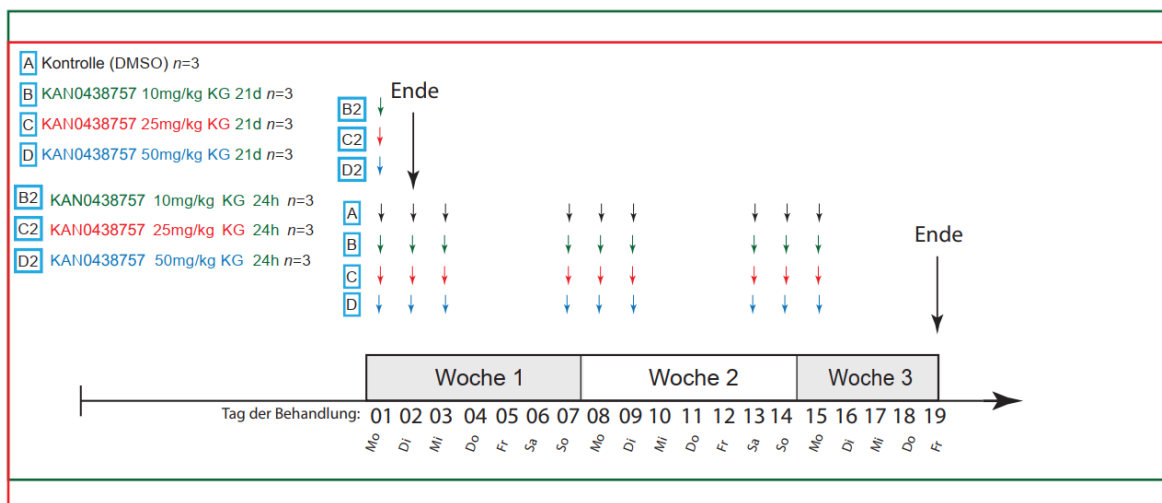


Abbildung 7: Behandlungsschema zur *In-vivo*-Dosisfindung von KAN0438757 in tumorfreien, immunkompetenten Mäusen Schema der i.p Injektionen (Pfeile) von KAN0438757 (10 mg/kg Körpergewicht (KG) (grün), 25 mg/ kg KG (rot), 50 mg/ kg KG (blau), DMSO (schwarz)) in C57BL/6 zur Evaluation der Toxizität und Dosisfindung

2.2.2.3 Patient-derived-xenografts (PDX)

2.2.2.3.1 Tumorumplantation

Für die Generierung der PDX-Modelle wurden Tiere der Linie NOD-SCID^{Prkdc} verwendet. Zur Vorbereitung auf die Operation wurde den Mäusen 30 min vor Beginn gewichtsadaptiert 0,05 ml/10 g KG des Schmerzmittels Caprofen (Caprieve - Norbrook® 50 mg/ ml) injiziert. Die Tiere wurden mit Isofluran narkotisiert. Die Narkose wurde mit einem Fluss an Sauerstoff von 1 l/ min und 4-5 Vol% Isofluran eingeleitet und mit 2-2,5 Vol% Isofluran über die Dauer der Operation aufrechterhalten. Nach Abschalten der Isofluranzufuhr erwachten die Tiere nach 1-2 min

Während der Narkoseeinleitungszeit wurden die Mäuse im Bereich des Operationsgebietes (Flanke) rasiert und regelmäßig der Zwischenzehenreflex getestet. Sobald dieser ausgefallen war, war die Anästhesie tief genug für den Beginn der Operation. Diese wurde auf einer Wärmeplatte durchgeführt, die mit einer sterilen Unterlage abgedeckt war. Nach Desinfektion des Operationsgebietes wurde mit einer Schere eine kleine Inzision in die Haut im Bereich der Flanke gesetzt, um durch diese eine kleine subkutane Tasche zu bilden. Sie sollte ausreichend groß für das zu implantierende Tumorgewebe sein. Das Tumorgewebe wurde in Stücken mit einer Pinzette in die Taschen eingebracht (mit einer kumulierten Größe von 2 mm²). Die Wunde wurde anschließend mit einer Tackerklammer verschlossen. Die Mäuse standen bis zum vollständigen Erwachen unter ständiger Beobachtung. Sobald sie sich adäquat bewegten, wurden sie wieder zurück in ihren Käfig mit bekannter Umgebung transferiert. Am nächsten Tag wurden die Mäuse visitiert, die Wunden begutachtet und der Gesundheitszustand besonders auf Schmerzzeichen geprüft. Ggf. wurde eine weitere Dosis des Schmerzmedikaments appliziert. Die Tackerklammern wurden bei guter Wundheilung nach sieben Tagen mit einem Klammerspreitzer vorsichtig entfernt.

2.2.2.3.2 Tumorexansion und Tumortransfer

Um genügend große Kohorten an Mäusen mit demselben Tumor bilden zu können, war es notwendig, Tumore über mindestens drei Generationen zu expandieren. Das menschliche Tumorgewebe wurde zunächst, wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben, in beide Flanken von ein bis zwei Mäusen implantiert. Diese bildeten somit die Generation F0.

Nach Implantation der Tumore wurden die Mäuse regelmäßig visitiert und die Tumore vermessen. Sobald die Tumore ein Volumen von 1000 mm³ überschritten, wurde die Maus euthanasiert und die Tumore zügig innerhalb weniger Minuten explantiert und zerteilt. Ein Teil des Tumorgewebes wurde in 4% PFA eingelegt, nach 24 h in 75% Ethanol transferiert, um das Gewebe schließlich in Paraffin einzubetten, anzufärben und um daraus verschiedene Schnitte und Färbungen anzufertigen. Ein weiterer Teil des explantierten Gewebes wurde in etwa 2 mm³ große Stücke zerlegt und in NutriFreeze D10 Kryokonservierungs-Medium bei -80°C kryokonserviert.

Der größte Anteil der Tumore wurde für den Transfer in die nächste Generation verwendet. Dafür wurde das Gewebe in etwa 2 mm³ große Stücke zerlegt und bis zur unmittelbaren Transplantation in DMEM F-12 auf Eis aufbewahrt. Die Implantation der Tumore in die zweite Generation F1 erfolgte genauso wie bei Generation F0. Die F1 Generation umfasste etwa vier bis acht Mäuse. Sobald die Tumore von F1 das vorgeschriebene Volumen von 1000 mm³ erreichten, wurden die Tiere ebenfalls euthanasiert und die Tumore wie beschrieben in die dritte Generation F2 überführt. Diese umfasste 25-35 Mäuse und stellte die Behandlungsgruppe dar.

Nicht immer wurden Tumore beider Flanken verwendet. Besonders schnell oder langsam wachsende Tumore wurden aus der Expansion ausgeschlossen. Der Ausschluss erfolgte, um eine Behandlungsgruppe mit möglichst vergleichbar wachsenden Tumoren zu bilden.

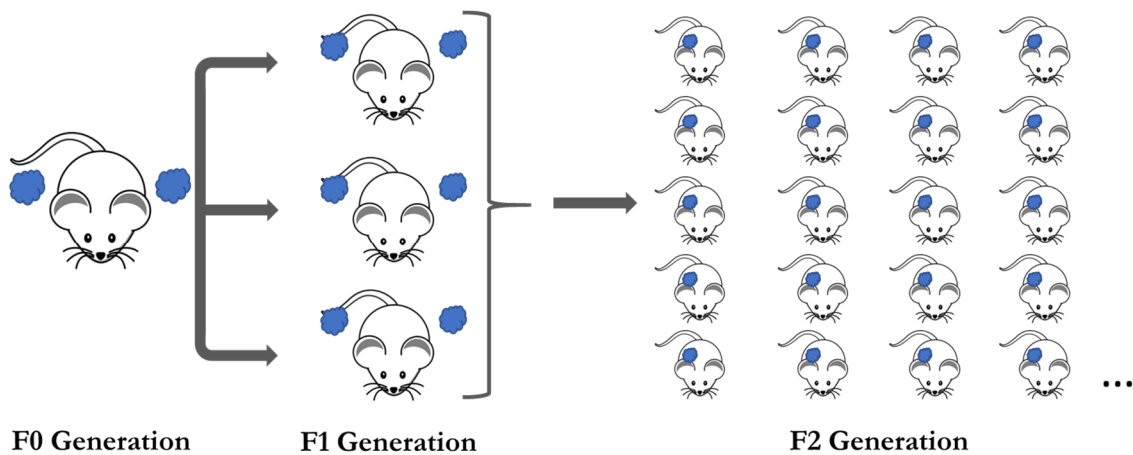


Abbildung 8: Generierung von PDX-Behandlungsgruppen Expansion der tumortragenden Mäuse über drei Generationen (F0, F1, F2) zur Generierung der Behandlungsgruppen (F2) für die therapeutische *In-vivo*-Evaluation von KAN0438757, Bildquelle:

<https://pixabay.com/de/vectors/maus-tier-wei%C3%9F-schwanz-ohren-306831/>, zuletzt abgerufen am 29.09.2021

2.2.2.3.3 Behandlung und Euthanasie am Ende des Experiments

Sobald die Tumoren der dritten Generation F2 ein mittleres Volumen von 100-150 mm³ erreichten, wurde die Behandlung gestartet. Dafür wurden die Mäuse in vier Behandlungsgruppen randomisiert. Die Aufteilung erfolgte nach Abstammung der Tumore aus der zweiten Generation, nach Volumen und Wachstumsgeschwindigkeit, die möglichst alle ausgeglichen auf die Gruppen verteilt sein sollten.

Die Behandlung erfolgte nach untenstehendem Behandlungsschema. (siehe Abbildung 9) Zwei Tage nach der letzten Behandlung wurden alle Tiere getötet. Dafür wurden ihnen 90 min vor der Tötung gewichtsadaptiert 3 µl/ g KG Pimonidazol (20 mg/ ml) und 10 µl/ g BrdU intraperitoneal (i.p.) injiziert.

Nach der Tötung wurde der Tumor explantiert und gewogen. Danach wurde er zunächst in der Mitte aufgeschnitten, um die Konsistenz und Gewebeviabilität anhand des Aussehens zu beurteilen. Von dem am wenigsten nekrotisch erscheinenden Gewebe wurden vier bis fünf Stücke (etwa 2 mm²) abgetrennt und in flüssigem Stickstoff für eine spätere Ribonukleinsäure (RNA)- und Proteinanalyse konserviert. Das übrige Tumorgewebe wurde in 4% PFA transferriert und für 24 h bei 4°C aufbewahrt, bevor es in 75% Ethanol überführt wurde, um es später in Paraffin einzubetten, zu schneiden, anzufärben und mikroskopisch auf verschiedene Marker untersuchen zu können.

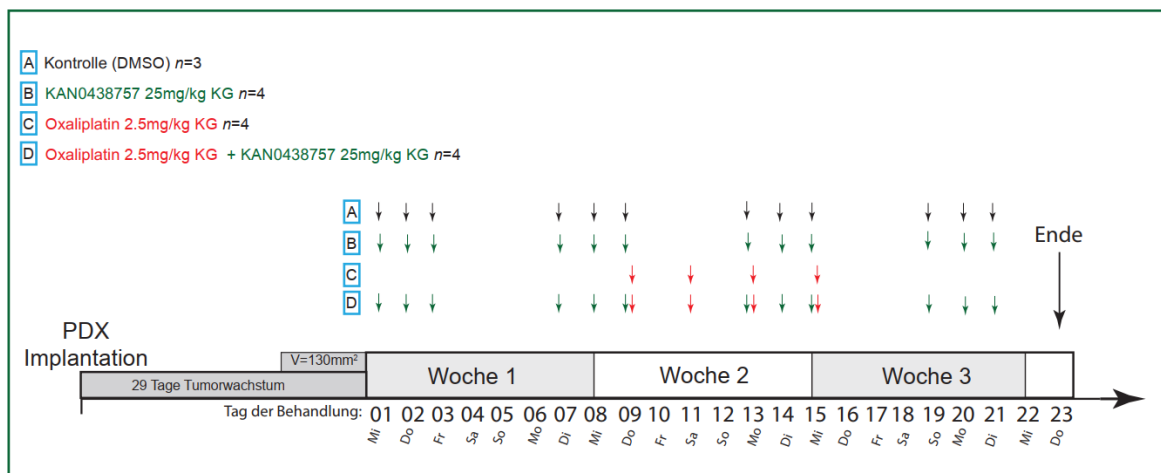


Abbildung 9: Behandlungsschema zur *In-vivo*-Charakterisierung von KAN0438757 in Kombination mit Oxaliplatin in murinen PDX-Modellen Schema der i.p. Injektionen (Pfeile) von KAN0438757 (grün) (25 mg/ kg KG) und/oder Oxaliplatin (rot) (2,5 mg/ kg KG) und DMSO (schwarz) in immundefizienten Mäusen der Sorte NOD-SCID^{Prkdc}, die Tumore mit einem durchschnittlichen Volumen von 130 mm³ tragen.

2.2.3 Probenaufbereitung und Färbungen

2.2.3.1 Paraffineinbettung

Das Gewebe wurde freischwimmend in 4% PFA für 24 h fixiert und danach mit 75% Ethanol gespült und in 75% Ethanol in den Einbether gehängt. Nach Fixierung wurde das Gewebe mit Paraffin in Metallformen ausgegossen und auf Kühlplatten abgekühlt.

Die Fixierung erfolgte nach dem Protokoll in Tabelle 13.

Tabelle 13: Protokoll zur Fixierung und Paraffinisierung

Reagenz	Inkubationszeit (h)
Ethanol 75%	2
Ethanol 75%	2
Ethanol 96%	2
Ethanol 96%	2
Ethanol 100%	2
Ethanol 100%	2
Xylol	1,5
Xylol	1,5
Paraffin	1
Paraffin	1
Paraffin	1

Protokoll freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Birgit Jünemann

2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosinfärbung

Die Schnitte wurden zunächst nach dem Protokoll in Tabelle 14 entparaffinisiert und zweimal in destilliertem Aqua (dH₂O) gespült. Danach wurden die Schnitte für 5 min in Hämatoxylin nach Mayer gelegt und mit dH₂O gespült. Es erfolgte eine Bläuung in warmem Leitungswasser für 5 min und eine Färbung mit Eosin für 30 min. Die Schnitte wurden erneut mit dH₂O gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe nach dem Protokoll aus Tabelle 14 in umgekehrter Reihenfolge (begonnen mit dem letzten Schritt) fixiert, bevor sie mit Vitro Clud auf Objektträgern mit Deckgläsern schützend eingedeckt wurden.

Tabelle 14: Protokoll zur Deparaffinisierung bei Hämatoxylin Eosin (H&E)-Färbung

Reagenz	Inkubationszeit (min)
Xylol	5
Xylol	5

Ethanol 100%	1
Ethanol 100%	1
Ethanol 96%	1
Ethanol 96%	1
Ethanol 70%	1
Ethanol 70%	1

Protokoll wurde modifiziert von B. Jünemann nach Romeis et al. 1989

2.2.3.3 Pimonidazol

Um den Grad der Hypoxie in den Tumoren zu analysieren, wurde eine immunhistochemische Färbung gewählt, für die eine Injektion der Tiere mit Pimonidazol notwendig war. Den Tieren wurden 90 min vor Tötung 3 µl/ g KG (20 mg/ ml) Pimonidazol i.p. appliziert, sodass es sich durch die Blutzirkulation bis in die Tumore verteilen konnte. Pimonidazol wird in hypoxischen Zellen reduziert und somit aktiviert. Dabei bildete es stabile Addukte in Proteinen, Peptiden und Aminosäuren. Diese Addukte, insbesondere die Proteinaddukte, können durch den Antikörper FITC-MAb-1 gebunden und über einen weiteren Antikörper sichtbar gemacht werden. (Hypoxyprobe, Inc. 2017)

Für die Vorbereitung der Schnitte wurde das Hypoxyprobe™ Plus Kit von hpi verwendet.

Zunächst erfolgte die Deparaffinisierung und Rehydrierung der Schnitte nach dem Protokoll in Tabelle 15.

Tabelle 15: Protokoll zur Deparaffinisierung und Rehydrierung

Reagenz	Inkubationszeit (min)
Xylol	5
Xylol	5
Ethanol 100%	1
Ethanol 100%	1
Ethanol 96%	1
Ethanol 96%	1
Ethanol 70%	1
Ethanol 70%	1
PBS	2

Protokoll wurde modifiziert von Dr. T. DeOliveira und Birgit Jünemann nach Romeis et al. 1989

Da die Antigene zum Teil durch das Paraffin maskiert wurden, war eine Demaskierung notwendig. Dafür wurden die Schnitte für 20 min in Zitratpuffer (pH=6) in einem Dampfdrucktopf gekocht. Nachdem die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie für 2 min in dH₂O und danach 2 min in PBS gewaschen. Dann erfolgte die Blockung der endogenen Peroxidase mit 3% H₂O₂/ PBS für 15 min bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden erneut für 2 min in PBS gewaschen, bevor eine weitere Blockung mit 3% BSA/ PBS für 30 min bei Raumtemperatur erfolgte. Im nächsten Schritt wurde der erste Antikörper FITC-MAb1 (verdünnt 1:50 in 3% BSA/ PBS) hinzugegeben und über Nacht im Kühlschrank bei +4°C inkubiert. Danach wurden die Schnitte 3x für 5 min in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit dem zweiten Antikörper (HRP-anti FITCAb2, verdünnt 1:50 in 3%BSA/ PBS) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach wieder 3x für 5 min in PBS gewaschen. Die weitere Färbung erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle mit DAB Chromogen (*Bright-DAB Substrate Kit*, ImmunoLogic, verdünnt 1:25). Dabei sollte auf den zeitlichen Verlauf geachtet werden, da die Reaktion antigenabhängig innerhalb von 30 sek oder in bis zu 10 min ablaufen kann.

Nach einem erneuten Waschgang mit dH₂O für 2 min, erfolgte die Co-Färbung mit Hämatoxylin (Kernfärbung, siehe Kapitel 2.2.3.2) mit anschließender Spülung zunächst in dH₂O und dann mit Leitungswasser für 5 min. Im letzten Schritt wurden die gefärbten Schnitte dehydriert (siehe Tabelle 15 in umgekehrter Reihenfolge, begonnen mit dem letzten Schritt) und im Fixiermedium (VibroClud) mit einem Deckglas auf den Objektträgern fixiert.

2.2.3.4 Immunhistochemische Färbung mit CD31, BrdU und Hoechst

Die Schnitte wurden zunächst deparaffiniert, wie im Protokoll in Tabelle 15 beschrieben. Die deparaffinierten Schnitte wurden für 10 min bei 37°C und pH 7,8 trypsiniert (0,05g Trypsin, 0,05 g CaCl₂, 50 ml *Tris-buffered saline* (TBS)) und danach mit dH₂O gespült. Als nächstes wurden die Schnitte für 20 min in Methanol-H₂O₂ gelegt (70 ml Methanol, 30 ml TBS, 10 ml H₂O₂) und danach erneut mit dH₂O gespült und dreimal für 5 min in TBS gewaschen. Anschließend erfolgte das 45-minütige TNB-Blockade. Auf die geblockten Schnitte wurde der CD31-Rat-Anti-Mouse-Antikörper gegeben (verdünnt 1:500 in TNB). Nach einer Inkubation über Nacht bei +4°C wurden die Schnitte in TBS-T gewaschen und danach mit Biotin (Donkey-Anti-Rat, verdünnt 1:200 in TNB) für 45 min inkubiert und erneut in TBS-T gewaschen. Dann erfolgte eine achtminütige Inkubation mit dem Farbstoff Cy3 (verdünnt 1:50 in *Amplification Diluent*) und die Waschung in TBS. Schließlich wurden die Schnitte wie zu Beginn für 20 min in Methanol-H₂O₂ gelegt und mit dH₂O gespült und in TBS gewaschen, bevor eine 45-minütige Inkubation mit Donkyserum (verdünnt 1:5 in TBS) erfolgte.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit BrdU (*Rabbit-Anti-Mouse*, verdünnt 1:200 in TNB) über Nacht bei +4°C inkubiert. Die Schnitte wurden, wie gewohnt, in TBS-T gewaschen und erneut mit Biotin für 45 min inkubiert. Nach der Waschung mit TBS-T wurden die Schnitte für 30 min mit Streptavidin-*Horserradish*-Peroxidase (verdünnt 1:100 in TBS-T) behandelt und waren nach der TBS-T-Waschung bereit für den dritten Farbstoff Cy5 (verdünnt 1:50 in *Amplification Diluent*). Die Schnitte wurden für 8 min gefärbt und anschließend in TBS gewaschen. Schließlich erfolgte der letzte Teil der Färbung mit Hoechst (1 mg/ ml, verdünnt 1:500 in PBS) für 30 min. Nach der TBS-Waschung wurden die Schnitte mit *ProLong Gold Antifade Reagent* und einem Deckglas schützend eingedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet.

2.3 Statistik und Analyse

Alle Ergebnisse wurden mit Hilfe von *GraphPad Prism 9.1.2 (226)* graphisch visualisiert und statistisch ausgewertet. Für die Auswertung der *In-vitro*-Experimente wurde der unpaarige *Student's t-Test* verwendet. Als Signifikanzniveau diente ein p-Wert $\leq 0,05$ (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,0001, **** p<0,00001). Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte +/- „*Standarderror of the mean*“ (SEM) angegeben.

Alle *In-vitro*-Experimente wurden mindestens in drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Die Ergebnisse sind, wenn nicht anders beschrieben, ein Pool aus allen gesammelten Daten.

Die statistische Auswertung der *In-vivo*-Experimente erfolgte entweder ebenfalls über den unpaarigen *Student's t-Test* oder über Oneway-ANOVA.

Die Experimente wurden einfach durchgeführt, umfassten jedoch pro Kohorte mindestens drei Tiere, sodass diese als Triplikate zu betrachten sind.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den neu entwickelten PFKFB3-Inhibitor KAN3804757 im KRK zu testen und herauszufinden, inwieweit er das Ansprechen auf bestehende Therapien verbessern und beeinflussen kann. Dafür wurden zunächst Auswirkungen auf kolorektale Zelllinien untersucht und schließlich auch seine Auswirkungen auf murine Organismen und die Entwicklung von Tumoren evaluiert.

3.1 *In-vitro*-Evaluation von KAN0438757

3.1.1 Einfluss auf Zellproliferation, Adhärenz, Form und Zellviabilität durch PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757

Zur Untersuchung der Auswirkung von KAN0438757 auf verschiedene Zelleigenschaften, führten wir einen \times CELLigence durch, welcher in 2.2.1.7 ausführlich beschrieben wird. Elektrische Impedanzen wurden in Echtzeit gemessen und ein Zellindex berechnet. Veränderungen dieses Zellindex gaben uns Hinweise auf die Veränderung von Zellproliferation, Zelladhärenz Zellgröße und -form, die durch die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von KAN0438757 zu unterschiedlichen Zeitpunkten hervorgerufen wurden.

Der Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass die kolorektalen Zelllinien HCT-116 und HT-29 ab Konzentrationen von 50 μ M signifikante Veränderungen in den benannten Zelleigenschaften aufweisen ($p < 0,05$). Bei Behandlung mit 10 μ M und 25 μ M KAN0438757 waren kaum Veränderungen zu erkennen.

HUVECS reagierten sensibler auf die PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757. Bereits ab einer Konzentration von 10 μ M KAN0438757 wurden ihre proliferativen Eigenschaften, ihre Adhärenz und ihre Morphologie signifikant beeinflusst.

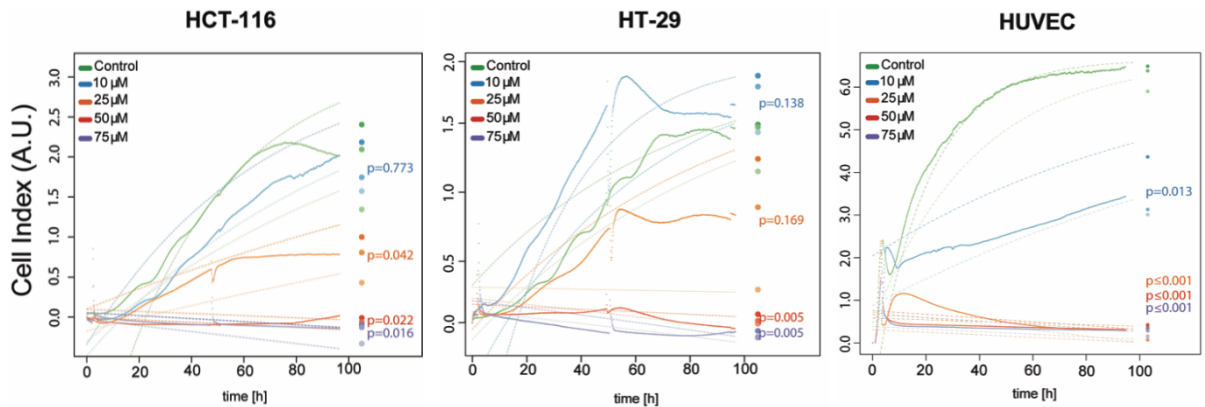
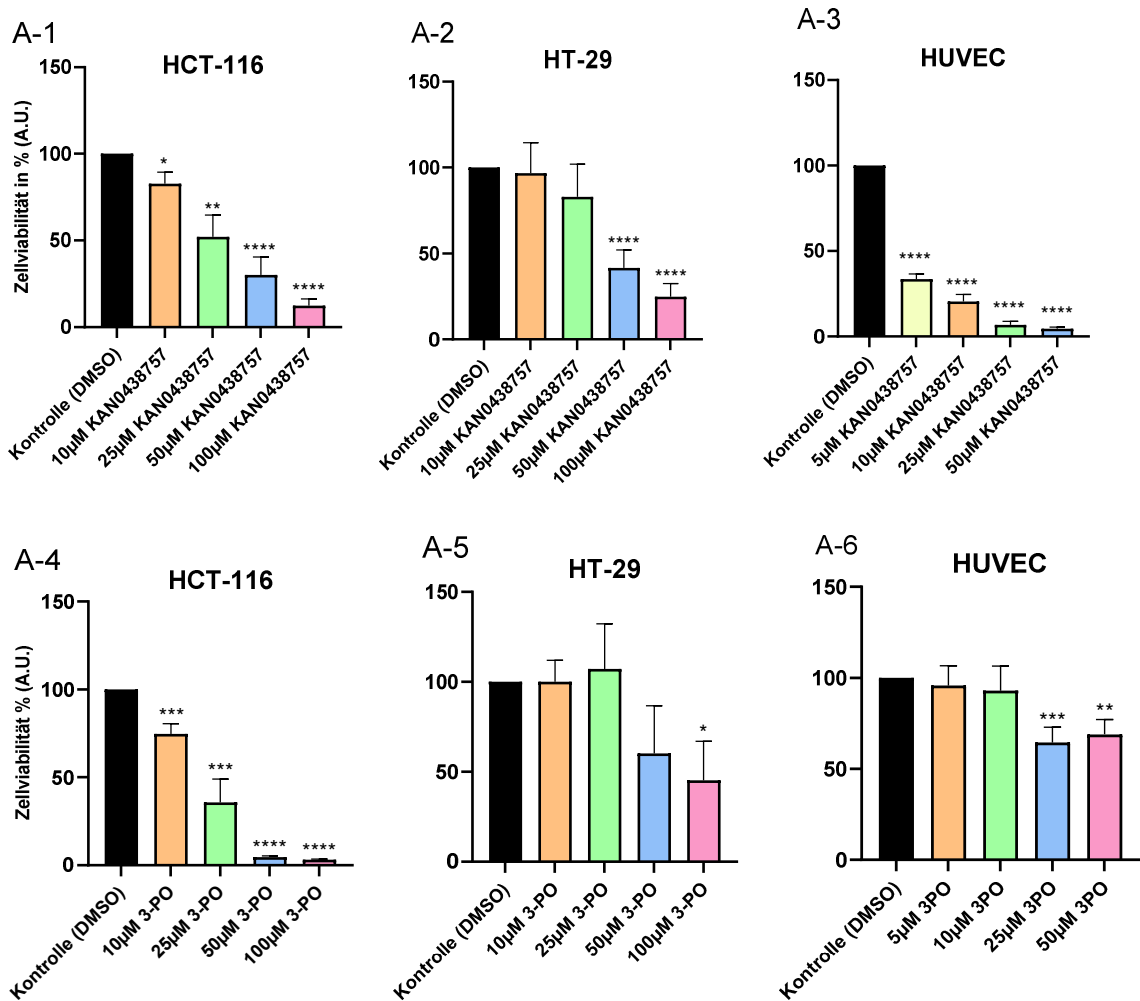


Abbildung 10: PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757 beeinflusst Proliferation, Adhärenz, Form und Größe von kolorektalen Tumorzellen und Endothelzellen \times CELLigence durchgeführt mit HCT-116, HT-29 und HUVEC behandelt mit KAN0438757 (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M 75 μ M) über 96h (kontinuierliche Linie), die gepunktete Linie zeigt die angepasste Sättigung als Logarithmus, die Daten sind repräsentative Ergebnisse einer aus drei Wiederholungen

Die Ergebnisse des \times CELLigence weisen darauf hin, dass es bei allen drei Zelllinien durch eine konzentrationsabhängige Inhibition von PFKFB3 mit KAN0438757 zu einer morphologischen Veränderung und womöglich Abnahme der zellulären metabolischen Kapazität, Viabilität und Erhöhung der Zelltodrate kommt. Welche zellindexbeeinflussenden Faktoren in welcher Weise verändert wurden, konnte jedoch nicht anhand des \times CELLigence bestimmt werden. Um dies genauer zu evaluieren, führten wir nach einer Behandlung mit KAN0438757 für 48 h einen CTB-Assay (Metabolische Kapazität und Zellviabilität) und einen LDH-Assay (Zelltod) durch. Um die Wirksamkeit von KAN0438757 mit dem schon bekannten PFKFB-Inhibitor 3-PO zu vergleichen, führten wir dieselben Experimente auch mit 3-PO durch. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 11 A1-6 und B1-6 dargestellt.

Ab 50 μ M KAN0438757 wird die Viabilität der kolorektalen Zelllinien HCT-116 und HT-29 deutlich vermindert. Äquivalent dazu steigt auch die Menge an freigesetzter LDH, welche einen Parameter für den Zelltod darstellt. Eine Inhibition des indirekt die Glykolyse beeinflussenden PFKFB3 mit KAN0438757 führt ab einer Konzentration von 25 μ M also zum Tod kolorektaler Krebszelllinien. Dabei ist zu sehen, dass HCT-116 deutlich sensibler auf die Senkung der Glykolyserate durch KAN0438757 reagiert als HT-29. Dies ist sowohl im Hinblick auf die Viabilität als auch in der erhöhten Rate des Zelltodes zu erkennen. Verglichen mit 3-PO scheint 3-PO auf HCT-116 ähnliche Auswirkungen auf die Zellviabilität zu haben wie KAN0438757, bei HT-29 jedoch erst mit einer sehr hohen Konzentration von 100 μ M. Im LDH-Assay ist die Effektivität von 3-PO und KAN0438757 in Bezug auf die Signifikanz der

Ergebnisse als ähnlich zu bewerten. Ab 25 μM kommt es durch beide Inhibitoren zu signifikant mehr LDH-Freisetzung als Zeichen des möglichen Zelltotes. Bei Betrachtung der Grafiken fällt jedoch auf, dass KAN0438757 prozentual ab 50 μM bei den Tumorzellen einen deutlich höheren LDH-Release verursacht als 3-PO, was auf eine höhere Wirksamkeit hindeutet. Auch die Viabilität der HUVECs wird signifikant durch KAN0438757 beeinflusst. Schon ab einer Konzentration von 5 μM sinkt sie unter 50% im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit DMSO behandelt wurde. 3-PO hat deutlich geringere Auswirkungen. Überraschenderweise ist im LDH-Assay keine Erhöhung der Zelltodesraten durch die Behandlung mit KAN0438757 zu erkennen. Bei 3-PO ist ein signifikanter Anstieg erst ab einer Konzentration von 50 μM zu sehen. Dies weist darauf hin, dass KAN0438757 nur in transformierten Zellen zu induziertem Zelltod führt, normale, nicht-transformierte Zellen jedoch nur in ihren viablen Stoffwechselprozessen, vorrangig in der Proliferation und Reduktionsfähigkeit beeinflusst. Um Limitationen der Assays als Ursache der Ergebnisse auszuschließen, sollte der Zelltod in komplexeren *In-vitro*-Systemen weiterhin untersucht werden.



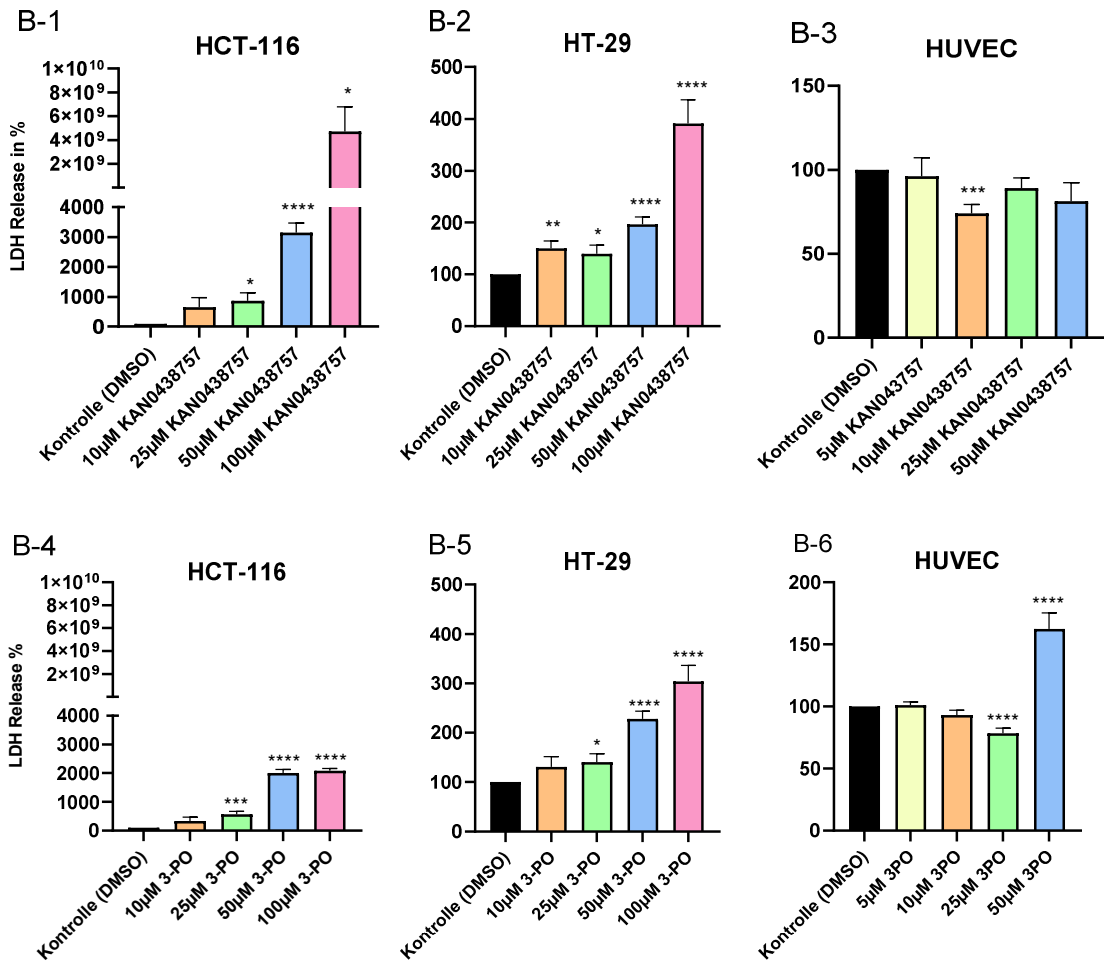


Abbildung 11: PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757 und 3-PO reduziert konzentrationsabhängig die Zellviabilität in Tumorzellen und Endothezellen und induziert Zelltod vorrangig in Tumorzellen und geringer in Endothelzellen A: CTB-Assay und B: LDH-Assay jeweils mit HCT-116, HT-29 und HUVEC, behandelt mit KAN0438757 (A- und B-1-3) oder 3-PO (A- und B-4-6) (5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) über 48h, die Daten sind gepoolt aus drei unabhängigen Experimenten, angegeben in Relation zum Mittelwert der Kontrolle =100% ± SEM

3.1.2 Einfluss auf die Zellmorphologie durch PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757

Da der *xCELLigence* nicht nur Hinweise auf Viabilität und Zelltod gibt, sondern der Zellindex auch durch die Morphologie der Zellen beeinflusst wird, untersuchten wir diese in einem separaten Experiment über eine Zeit von 48 h. Die Abbildung 12 zeigt repräsentative Bilder, wie sich die Zellen unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen KAN0438757 morphologisch veränderten.

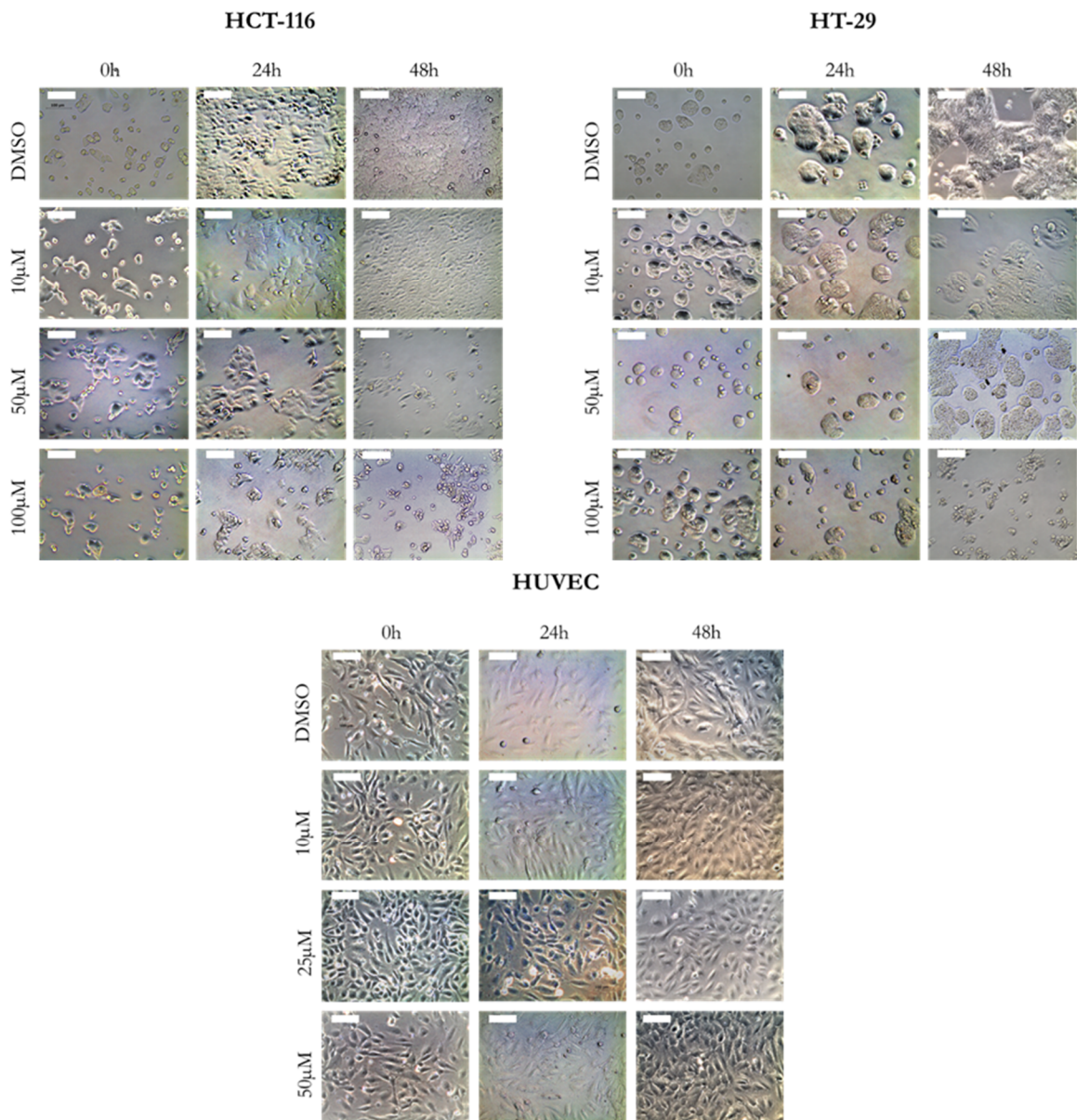


Abbildung 12: PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 führt zu zellmorphologischen Veränderungen in Tumorzellen und Endothelzellen Behandlung von kolorektalen Tumorzellen und Endothelzellen mit KAN0438757 (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M für HCT-116 und HT-29 und 10 μ M, 25 μ M 50 μ M für HUVEC) über 48 h, repräsentative Bilder nach 0 h, 24 h und 48 h Inkubation; Skalenbalken entspricht 100 μ m

Zu sehen ist, dass die kolorektalen Zelllinien ab einer Konzentration von 50 μ M deutliche Veränderungen aufweisen. Bereits nach 24 h sehen sie gestresst aus. Sie beginnen zu schrumpfen und ihre äußere Form wirkt entrundet. Es scheinen sich kleine Vesikel abzuschneiden. Vermehrt sind abgelöste, frei schwimmende Zellen zu sehen, die sich in wachsenden Klumpen zusammenlagern. Im Vergleich zur Kontrollgruppe bildet sich kein konfluenter Zellteppich.

pich aus. Bei den mit 100 μM KAN0438757 behandelten Zellen sind diese Erscheinungen in extremerer Weise ausgeprägt. Nach 48 h sind in den Gruppen 50 μM und 100 μM KAN0438757 nahezu alle Zellen abgelöst, geschrumpft, entrundet und haben sich zu größeren Klumpen zusammengelagert (48h 100 μM HT-29 und HCT-116).

Die HUVECs beginnen bereits bei geringeren Konzentrationen ihre Morphologie zu verändern. 10 μM KAN0438757 zeigen nach 48 h und 25 μM KAN0438757 zeigen bereits nach 24 h morphologische Auswirkungen auf die HUVECs. Die sonst leicht elongierten Zellen, wirken rundlicher im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO. Einige Zellen weisen wie die kolorektalen Zelllinien vesikuläre Einschlüsse auf. Diese sind auch als vesikuläre Abschnürungen freischwimmend im Medium zu erkennen. Die Konfluenz und Proliferation scheinen jedoch weniger beeinflusst als bei den Tumorzellen.

Sowohl die Beobachtung der Morphologie als auch die Ergebnisse des *xCELLigence* gaben uns Hinweise darauf, dass KAN0438757 die Adhärenz der Zellen beeinflusst. Daher vermuteten wir, dass KAN0438757 in der Lage ist, das Migrations- und Invasionsverhalten *in vitro* zu verändern.

Um dies zu untersuchen, führten wir zunächst einen Wundheilungsassay durch. Dafür wurden die Zelllinien HCT-116, HT-29 und HUVEC wie in 2.2.1.8 beschrieben ausgesetzt und inkubiert. Nach der Behandlung mit KAN0438757 in unterschiedlichen Konzentrationen wurde das Migrationsverhalten der Zellen bis zu 54 h beobachtet und die zellfreie Fläche in regelmäßigen Abständen gemessen. Die Ergebnisse wurden in Relation zur Kontrolle gesetzt und sind in der Abbildung 13 A dargestellt. Abbildung 13 B zeigt repräsentative Bilder des Invasions-Assays.

Das Experiment wurde jeweils beendet, sobald die zellfreie Fläche der Kontrollgruppe vollständig verschlossen war. Die Unterschiede in der Beobachtungszeit ergeben sich u.a. daraus, dass die Zelllinien nicht dieselbe Verdopplungszeit haben. (Spitzner et al. 2010)

Je schneller die zellfreie Fläche geschlossen wurde, desto schneller proliferierten die Zellen und desto besser war das Migrationsverhalten der Zellen und ihre Fähigkeit Zell-Zell-Kontakte zu bilden. KAN0438757 beeinflusst dieses Verhalten negativ. Dabei reagieren HCT-116 sensibler auf KAN0438757 als HT-29. Bereits ab einer Behandlung mit 10 μM KAN0438757 über mindestens 30 h wurde ihre Fähigkeit zu migrieren signifikant eingeschränkt. Bei einer Konzentration von 75 μM wurden die HCT-116 so stark geschädigt, dass sie sich von den Platten ablösten und keine Messung mehr möglich war. Für eine Behandlungsdauer länger als 6 h können für die Konzentration daher keine Ergebnisse angegeben werden. Das Migrationsverhalten von HT-29 wird erst durch eine Konzentration von 50 μM

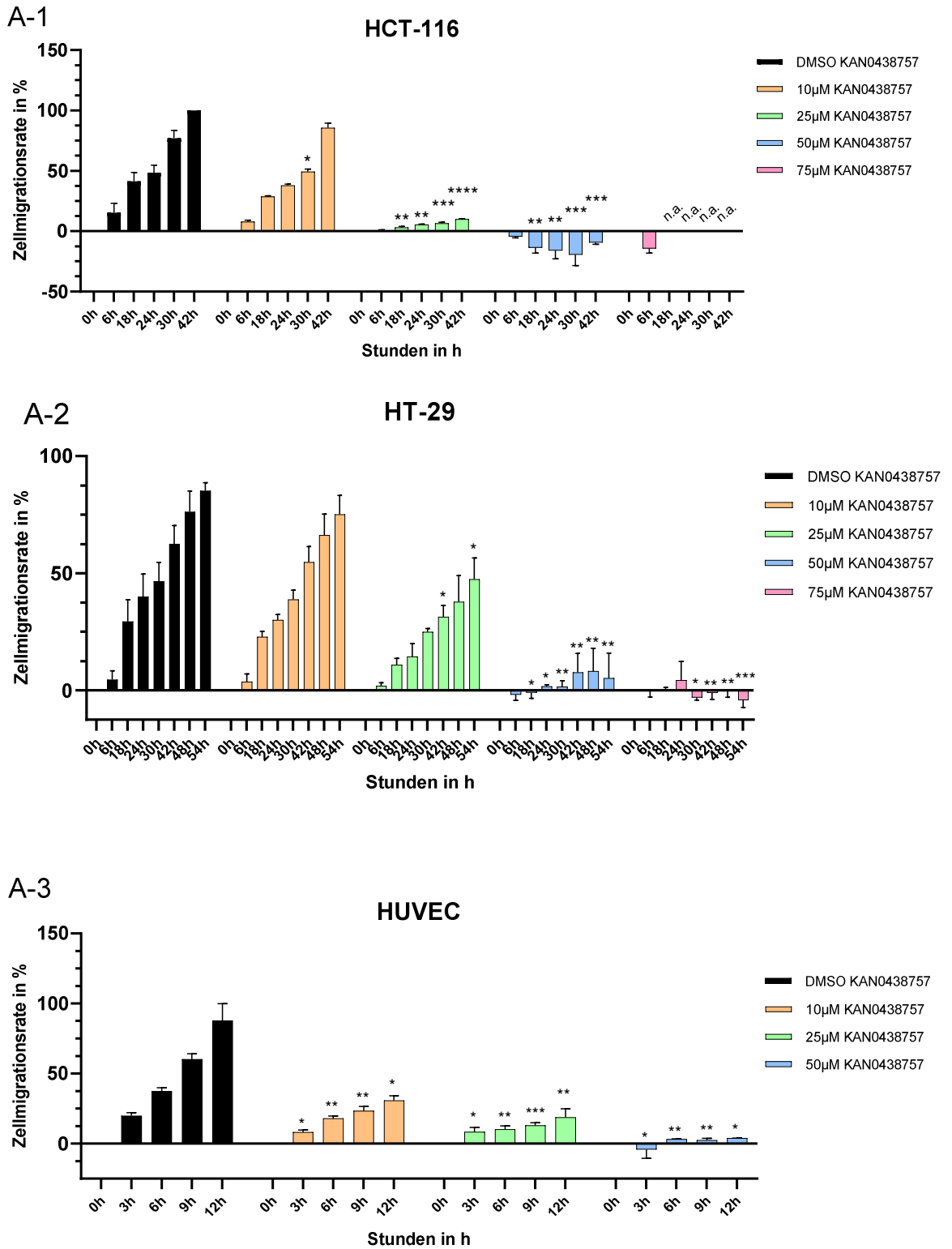
KAN0438757 signifikant gebremst. Bei einer Behandlung mit 25 μM KAN0438757 ist eine längere Inkubationszeit von mindesten 30 h notwendig, um Unterschiede zur Kontrollgruppe zu sehen.

Wie auch in den vorherigen Experimenten, reagieren HUVECs am sensibelsten auf eine Behandlung mit KAN0438757. Bereits in der Behandlungsgruppe 10 μM lassen sich nach 3 h signifikante Einschränkungen in ihrer Beweglichkeit und im Ausbau von Zell-Zell-Kontakten erkennen.

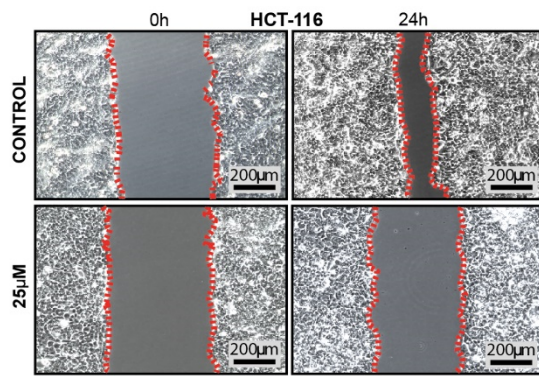
Zur Evaluation des Invasionsverhalten führten wir mit den kolorektalen Zelllinien HCT-116 und HT-29 einen modifizierten Invasions-Assay durch, wie er in 2.2.1.6 detailliert beschrieben ist.

Aus der Abbildung 13 C geht hervor, dass beide kolorektalen Zelllinien bereits durch 10 μM KAN0438757 in ihrem Invasionsverhalten gebremst werden. Unter Einbezug der Ergebnisse aus dem *xCELLigence*, können diese Ergebnisse als unabhängig von Proliferationseinschränkungen angesehen werden. Dies lässt vermuten, dass KAN0438757 das Potenzial haben könnte, die Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen einzuschränken.

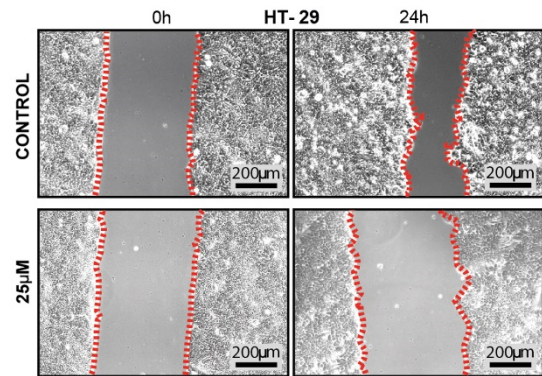
Ergebnisse



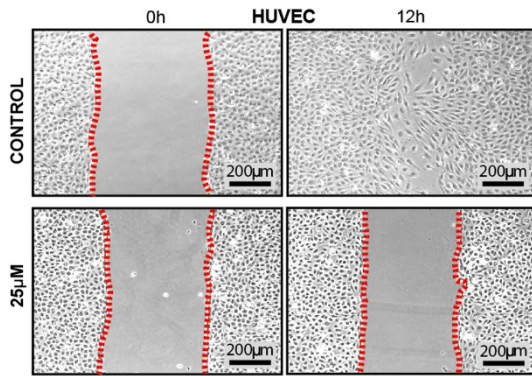
B-1



B-2



B-3



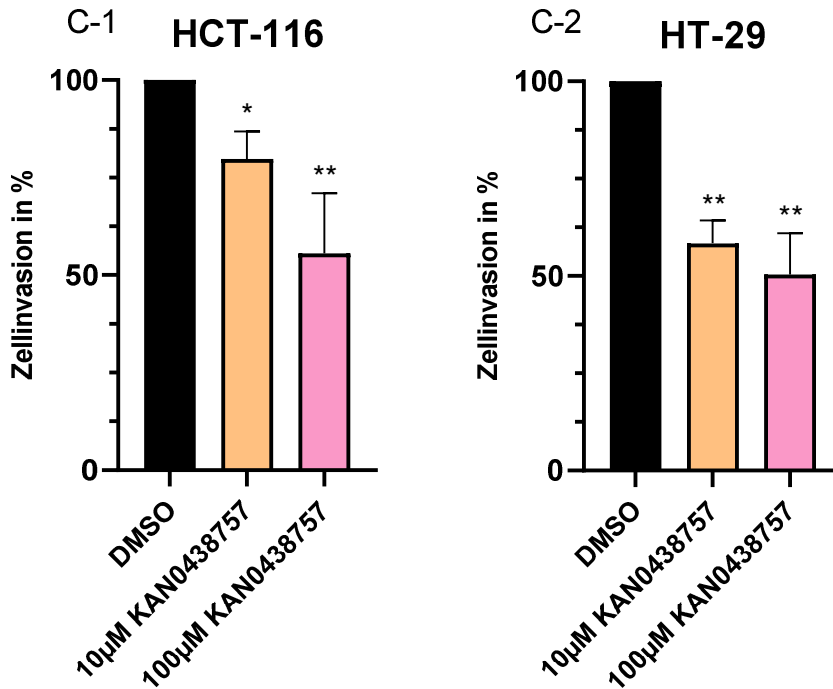


Abbildung 13: PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 hemmt die Migration und Invasion von Tumorzellen A-1-3: Wundheilungsassay mit HCT-116 (A-1), HT-29 (A-2) und HUVEC A-3), Behandlung mit KAN0438757 (10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM) über 12 h-54 h B1-3: Repräsentative Bilder des Wundheilungsassay mit HCT-116 (B-1), HT-29 (B-2), HUVEC (B-3), behandelt mit KAN0438757 (25 µM), DMSO (Kontrolle) nach 0 h und 24 h(HCT-116, HT-29), 12 h (HUVEC), C1-2: Invasion Assay mit HCT-116 (C-1) und HT-29 (C-2), behandelt mit KAN0438757 (10 µM, 100 µM) über 96 h, Daten sind gepoolt aus drei unabhängigen Experimente, Daten sind angegeben in Relation zu Kontrolle = 0 h (A-1-3), 100% (C1-2) ±SEM

3.2 *In-vivo*-Dosistestung von KAN0438757

Da die *In-vitro*-Experimente vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit von KAN0438757 lieferten, erwarteten wir großes Potenzial auch für den Einsatz *in vivo*. KAN0438757 wurde bisher niemals vorher in einem Lebewesen getestet. Somit war es notwendig mögliche toxische Auswirkungen der neuen Substanz auf ein biologisches Organsystem zu untersuchen und eine tolerierbare Dosierung zu evaluieren, bevor erste therapeutische Versuchsansätze gestartet werden konnten. Dafür verwendeten wir neun Wochen alte männli-

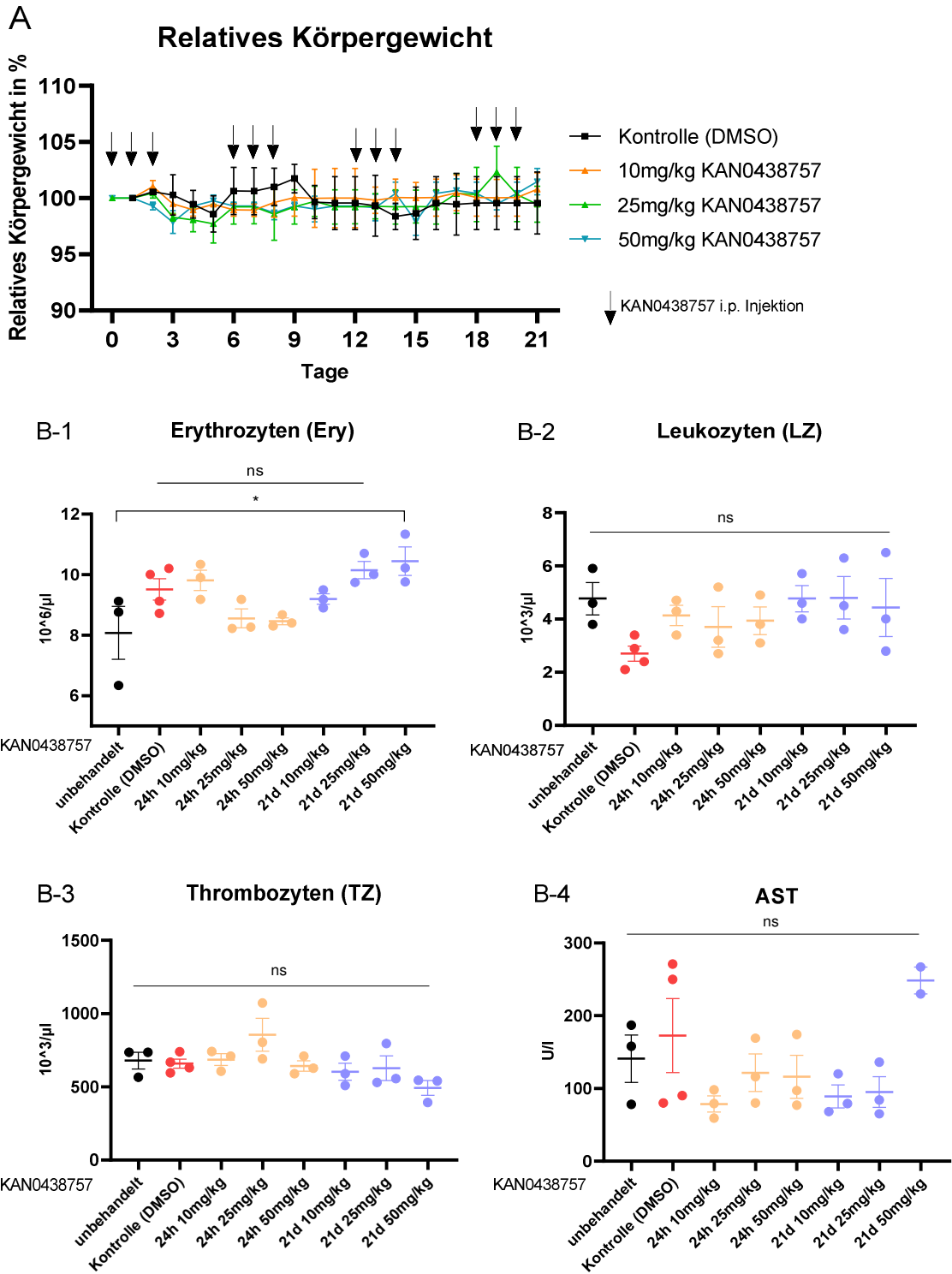
che, immunkompetente und unbehandelte Mäuse (C57BL/6N). Diese wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen KAN0438757 (10 mg/ kg, 25 mg/ kg, 50 mg/ kg) per intraperitoneale Injektion für 24 Stunden bis zu 21 Tage behandelt. Das Injektionsschema und die genaue Durchführung sind detailliert unter 2.2.2.2 beschrieben.

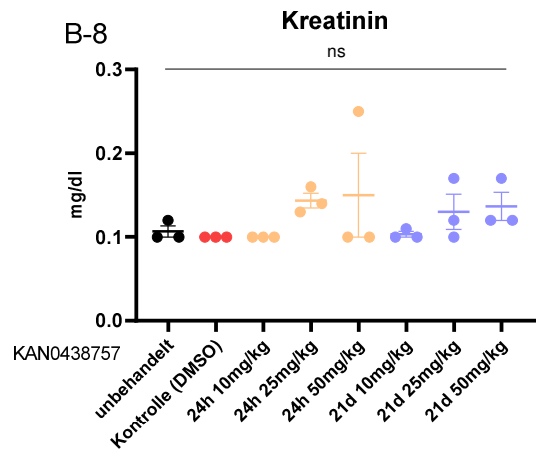
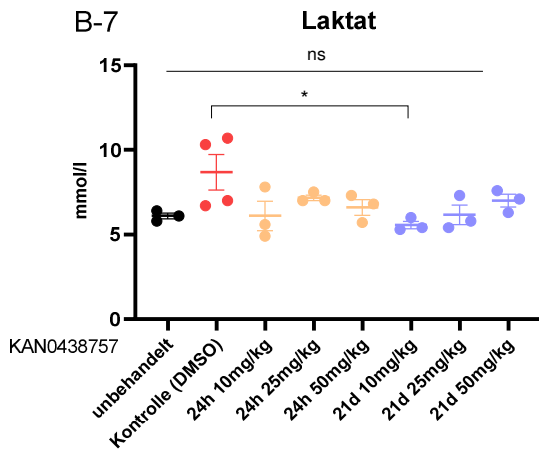
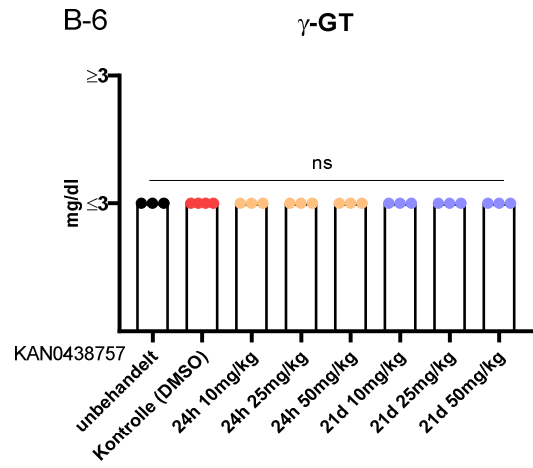
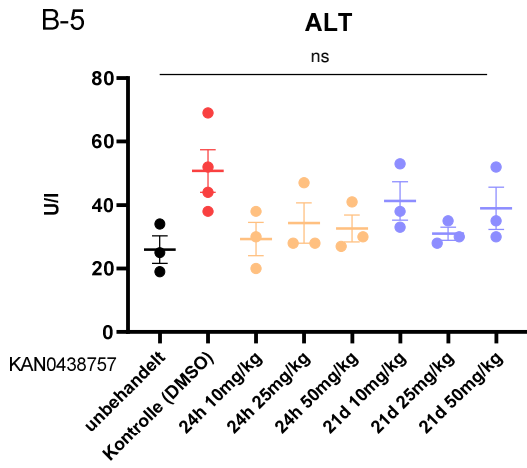
Die kurze und einmalige Behandlung für 24 h diente zur Evaluation der akuten Toxizität von KAN0438757. Mit der Behandlung über 21 d sollten anschließend Bedingungen simuliert werden, wie KAN0438757 zukünftig in vorklinischen *In-vivo*-Experimenten eingesetzt werden könnte und langfristige systemische Effekte durch wiederholte Zyklen untersucht werden.

Keines der Tiere, weder aus der Behandlungsgruppen von 24 h noch von 21 d, zeigte Veränderungen in seinem typischen Verhalten. Die Mäuse zeigten keine Aggressivität, keine Auffälligkeiten in der Fellpflege oder Körperhaltung, was Hinweise auf Schmerz oder Unwohlsein geben könnte. Es konnten während der täglichen Beobachtung keine Veränderungen der Atem- oder Pulsfrequenz oder der Körpertemperatur festgestellt werden. Auch das Trink- und Essverhalten blieb unverändert. Abbildung 14 A zeigt die relative Entwicklung der Körpergewichte über die Behandlungsdauer von 21 Tagen. Dieses blieb für alle Tiere mit lediglich geringen Abweichungen konstant.

Für die weitere Untersuchung von Effekten auf das Organsystem, fertigten wir Blutbilder (Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten) an und führten Messungen der Leberfunktionsparameter (AST, ALT, γ -GT), Kreatinin und Laktat durch. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 14 B1-8 dargestellt. Zu sehen ist, dass durch die Behandlung von KAN0438757 mit keiner Konzentration weder nach 24 h noch nach 21 d signifikante Unterschiede zu der unbehandelten Gruppe festgestellt werden konnten. KAN0438757 zeigt also keine relevante Toxizität, welche diese Parameter beeinflusst.

Um dies weiter zu verifizieren, untersuchten wir H&E gefärbtes Gewebe von Lunge, Herz, Leber, Nieren, Milz, Duodenum und Colon auf mögliche Schädigungen oder Veränderungen. Wir konnten für keines der benannten Organe gewebetoxische Auswirkungen von KAN0438757 feststellen. Repräsentative Bilder sind in der nachfolgenden Abbildung 14 C dargestellt.





C

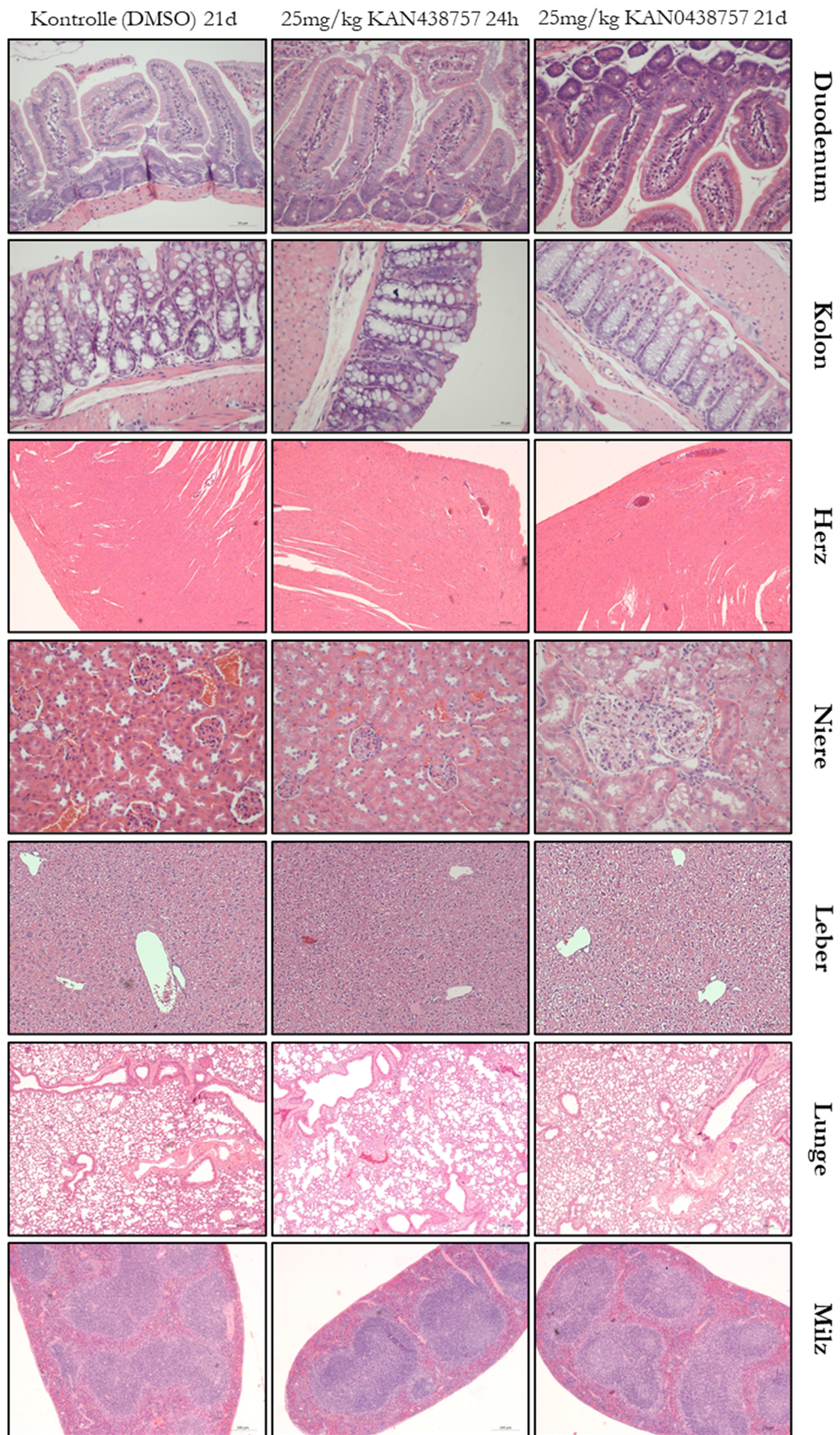


Abbildung 14: Evaluation der Toxizität von KAN0438757 in immunkompetenten Mäusen A: Kurve der relativen Körpergewichte während der Behandlung von C57BL/6 mit KAN0438757 (10 mg/ kg KG, 25 mg/ kg KG, 50mg/ kg KG) und DMSO (Kontrolle), B-1-8: Blutbildparameter: (Erythrozyten (B-1), Thrombozyten (B-2), Leukozyten (B-3)) und biochemische Serumanalysen von AST (B-4), ALT (B-5), γ -GT (B-6) und Laktat (B-7) und Kreatinin (B-8) nach Behandlung mit KAN0438757 in unterschiedlichen Konzentrationen für 24 h und 21 d, DMSO (Kontrolle) und unbehandelt, C: Repräsentative Bilder der Organe von C57BL/6N nach Behandlung mit 25 μ M KAN0438757 für 24 h und 21 d

3.3 Evaluation von KAN0438757 in PDX-Modellen

Die Ergebnisse aus der *In-vivo*-Dosisstestung lassen uns zu dem Schluss kommen, dass KAN0438757 keine systemischen oder toxischen Auswirkungen auf Organe hat und von Mäusen gut toleriert wird. Mit diesen Annahmen konnten wir weitere Experimente für erste therapeutische Einsätze planen.

Es sollten die Effekte von KAN0438757 auf das Tumorwachstum und die Ausbildung von Gefäßen allein und in Kombination mit etablierter Chemotherapie, Oxaliplatin, untersucht werden.

Dafür generierten wir PDX-Modelle wie unter 2.2.2.3 beschrieben. Wir verwendeten originales Gewebe eines Kolonkarzinoms aus dem Kolon ascendens (HROC69). Genauere Informationen zur Charakterisierung des Tumorgewebes wurden von Kuehn et al. (2016) dokumentiert.

Sobald die Tumore ein mittleres Volumen von 100-150 mm³ erreicht hatten, wurden die Tiere in vier vergleichbare Behandlungsgruppen eingeteilt (DMSO, 25 mg/ kg KAN0438757, 2,5 mg/ kg Oxaliplatin, 25 mg/ kg KAN0438757 + 2,5 mg/ kg Oxaliplatin). Das Behandlungsschema und die genaue Durchführung sind in 2.2.2.3.3 zu finden.

3.3.1 Auswirkungen der Behandlung auf Gewicht und Verhaltensweisen der PDX-Modelle

Während der gesamten Behandlungszeit wurden die Tiere täglich visitiert und ausführlich beobachtet. Dabei konnte bei den Tieren aus der Kontrollgruppe und den Tieren, die nur KAN0438757 erhielten keine Veränderungen in ihrem typischen Verhalten, keine mangelnde Fellpflege und keine Veränderungen in der Atem- oder Herzfrequenz oder Körpertemperatur festgestellt werden. Wie in der Abbildung 15 zu sehen ist, ergaben sich für das relative Kör-

pergewicht keine signifikanten Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen. Die Tiere aus der Kontroll-, KAN0438757-allein-Gruppe und Oxaliplatin-allein-Gruppe nahmen sogar ein wenig zu. Insgesamt konnten wir auch auf das Trink- und Essverhalten keinen relevanten Einfluss beobachten.

Bei wenigen Tieren aus den beiden Behandlungsgruppen mit Oxaliplatin konnten wir etwa zwei bis drei Tage nach Injektion von Oxaliplatin Diarrhöen feststellen und eine geringe Gewichtsabnahme verzeichnen. Die Tiere erholten sich jedoch nach kurzer Zeit und nahmen das verlorene Gewicht wieder zu. Im Verhalten zeigten alle Tiere aus den beiden Gruppen mit Oxaliplatin Auffälligkeiten. Das Fell war struppig, die Tiere wirkten gestresst und entweder verlangsamt in ihren Bewegungen oder sie brachten uns als Manipulatoren vermehrt aggressives Verhalten entgegen. Basierend auf unseren Beobachtungen während der Dosistestung und der Behandlungsgruppe mit KAN0438757 allein, führten wir diese Verhaltensänderungen auf die Behandlung mit Oxaliplatin zurück.

Im Vergleich der beiden Gruppen mit Oxaliplatin war unser subjektiver Eindruck, dass die Tiere aus der Kombinationsbehandlung vermehrte Auffälligkeiten zeigten und KAN0438757 die toxische Wirkung von Oxaliplatin zu verstärken vermag.

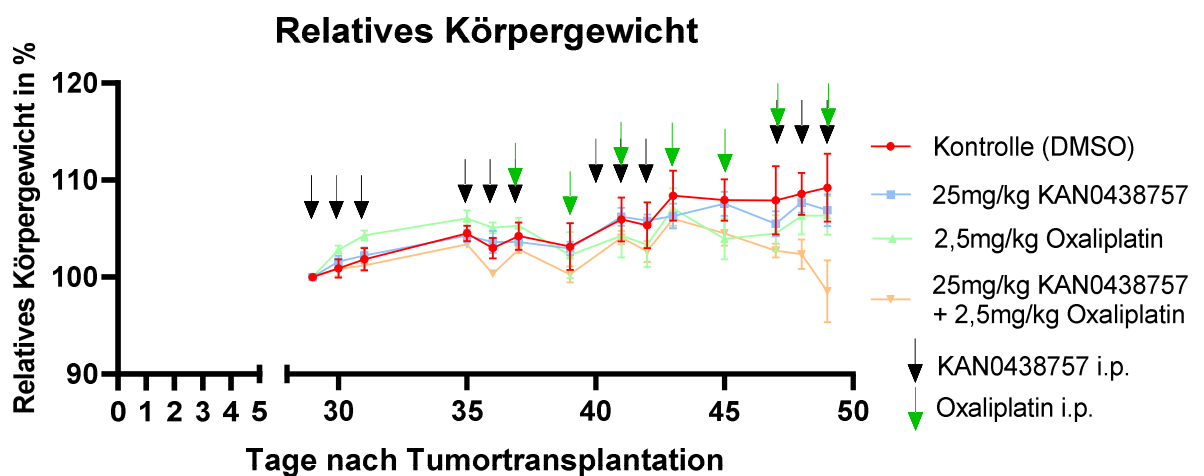
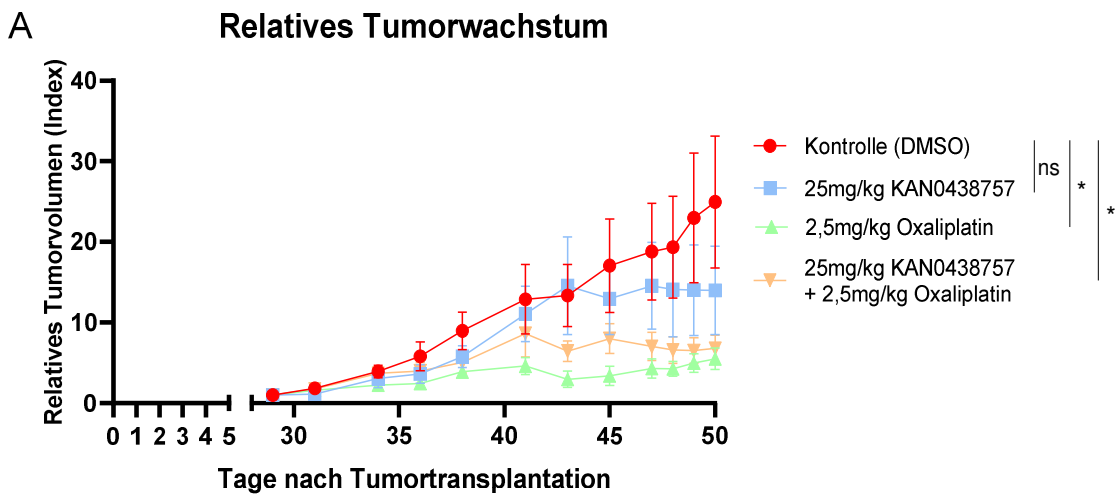


Abbildung 15: PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 zeigt keinen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht Kurve der relativen Körpergewichte während der Behandlung von NOD-SCID-PDX mit KAN0438757 (25 mg/ kg KG) (schwarz) und/oder, Oxaliplatin (2,5 mg/ kg KG) (grün) oder DMSO (Kontrolle) (hier nicht dargestellt, siehe dazu Behandlungsschema in Abbildung 9)

3.3.2 Auswirkungen der Behandlung auf das Tumorwachstum

Während der gesamten Behandlung wurden die Tumore regelmäßig gemessen und die Volumina als relative Werte zu dem Anfangsvolumen graphisch aufgetragen. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, wuchsen die Tumore der Kontrollgruppe kontinuierlich, jedoch unterschiedlich schnell, was die breite Streuung der Volumina innerhalb der Kohorte erklärt. Durch die Behandlung mit KAN0438757 allein konnte das Wachstum zwar verlangsamt werden, die Tumorumfänge wichen jedoch nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe ab. Durch die Behandlung mit Oxaliplatin allein und KAN0438757 und Oxaliplatin in Kombination wurde das Tumorwachstum stark gebremst. Am Ende des Experiments waren die Tumore dieser beiden Gruppen signifikant kleiner als in der Kontroll- und KAN0438757-allein-Gruppe. Auch die Gewichte der Tumore am Ende des Experiments sind nach Behandlung mit Oxaliplatin signifikant geringer. Die Tumore aus der Behandlungsgruppe mit KAN0438757 und KAN0438757 in Kombination mit Oxaliplatin wiesen ebenso ein signifikant geringeres Gewicht als die Tumore der Kontrollgruppe auf. Die Gewichte scheinen jedoch nicht direkt mit dem Tumorwachstum zu korrelieren. Daher führten wir Analysen des histologischen Aufbaus der Tumore durch.



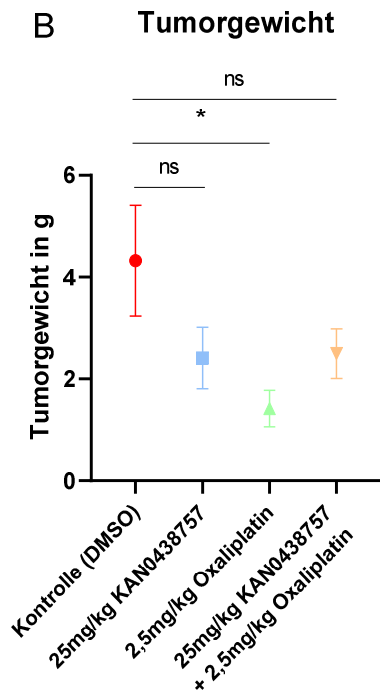


Abbildung 16: PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 führt zu Hemmung des Tumorzwachstums A: Relatives Tumorzwachstum während der Behandlung mit KAN0438757 (25 mg/ kg KG) und/oder Oxaliplatin (2,5 mg/ kg KG) oder DMSO (Kontrolle), Daten angegeben als relative Werte zum Tumorzvolumen am Tag 0 der Behandlung (Index) \pm SEM, Statistik angegeben als Vergleich der Endvolumina, B: Tumorgewichte in Gramm nach Abschluss der Behandlung

3.3.3 Auswirkungen der PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757 auf die Histologie der Tumoren

Nach Beendigung des Experiments wurden die Tumore in Alkohol und Formalin fixiert und nach unterschiedlichen Methoden angefärbt, um die Morphologie und den histologischen Aufbau näher zu untersuchen. Repräsentative Bilder von der H&E-Färbung in Abbildung 17 zeigen, dass die kleineren Tumoren, die mit Oxaliplatin oder mit Oxaliplatin und KAN0438757 behandelt wurden, mehr nekrotische Areale aufweisen als die Tumoren der Kontrollgruppe oder aus der Behandlung mit KAN0438757 allein.

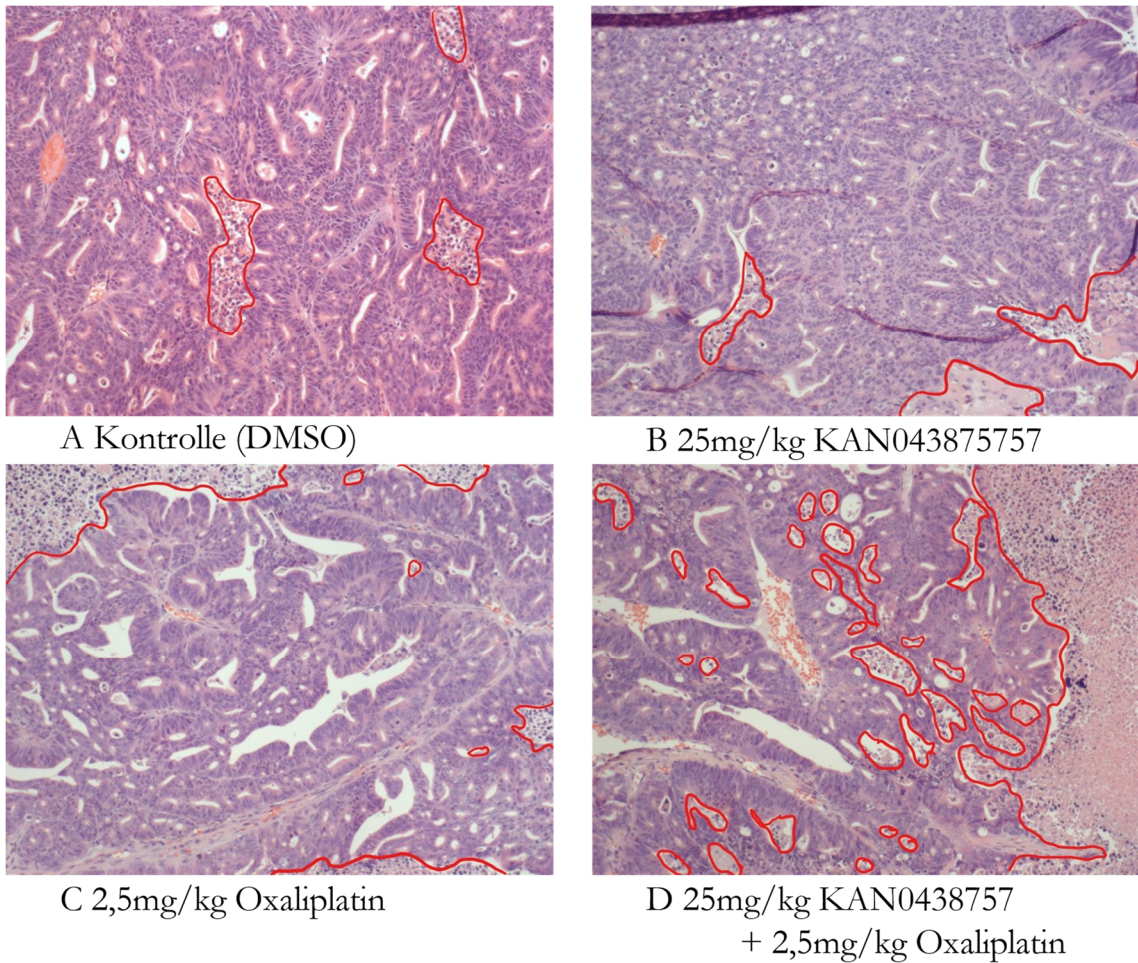


Abbildung 17: PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 in Kombination mit Oxaliplatin und Oxaliplatin allein erhöhen die Rate an nekrotischen Arealen in Tumoren Hämatoxylin&Eosin-Färbung zeigt nekrotische Areale im Tumorgewebe nach Abschluss der Behandlung, repräsentative Bilder der verschiedenen Behandlungsgruppen A: Kontrollgruppe (DMSO), B: 25 mg/ kg KAN0438757, C: 2,5 mg/ kg Oxaliplatin, D: 25 mg/ kg KAN0438757 + 2,5 mg/ kg Oxaliplatin

Mit Hilfe der Pimonidazol-Färbung untersuchten wir den Anteil an hypoxischen Arealen in den Tumoren. Wie Abbildung 18 A1-2 zu entnehmen ist, nimmt der Anteil der hypoxischen Areale in Relation zum Tumolvolumen durch die Therapie mit KAN0438757 allein und Oxaliplatin allein signifikant zu. Unter Therapie mit KAN0438757 und in Kombination mit Oxaliplatin hingegen ist im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Zunahme an hypoxischen Arealen zu erkennen. Hervorzuheben ist der signifikante Unterschied zwischen der Behandlung mit Oxaliplatin allein und der Kombinationsbehandlung mit KAN0438757. Abbildung 19 zeigt repräsentative Bilder der Schnitte mit Pimonidazolfärbung.

Für eine verlässlichere Analyse wurde versucht, bei den Bildern die nekrotischen Areale auszuschließen. Um die Viabilität und Aktivität der Tumorzellen zu beurteilen, fertigten wir eine Färbung mit BrdU an, welche uns Hinweise auf die Proliferationsaktivität der Zellen gab. Wie in Abbildung 18 B dargestellt und anhand der Tumorwachstumskurven zu erwarten, ist das Gewebe nach Behandlung mit Oxaliplatin und KAN0438757 in Kombination mit Oxaliplatin signifikant weniger proliferativ. KAN0438757 allein beeinflusst die Proliferationsrate der Tumorzellen jedoch nicht.

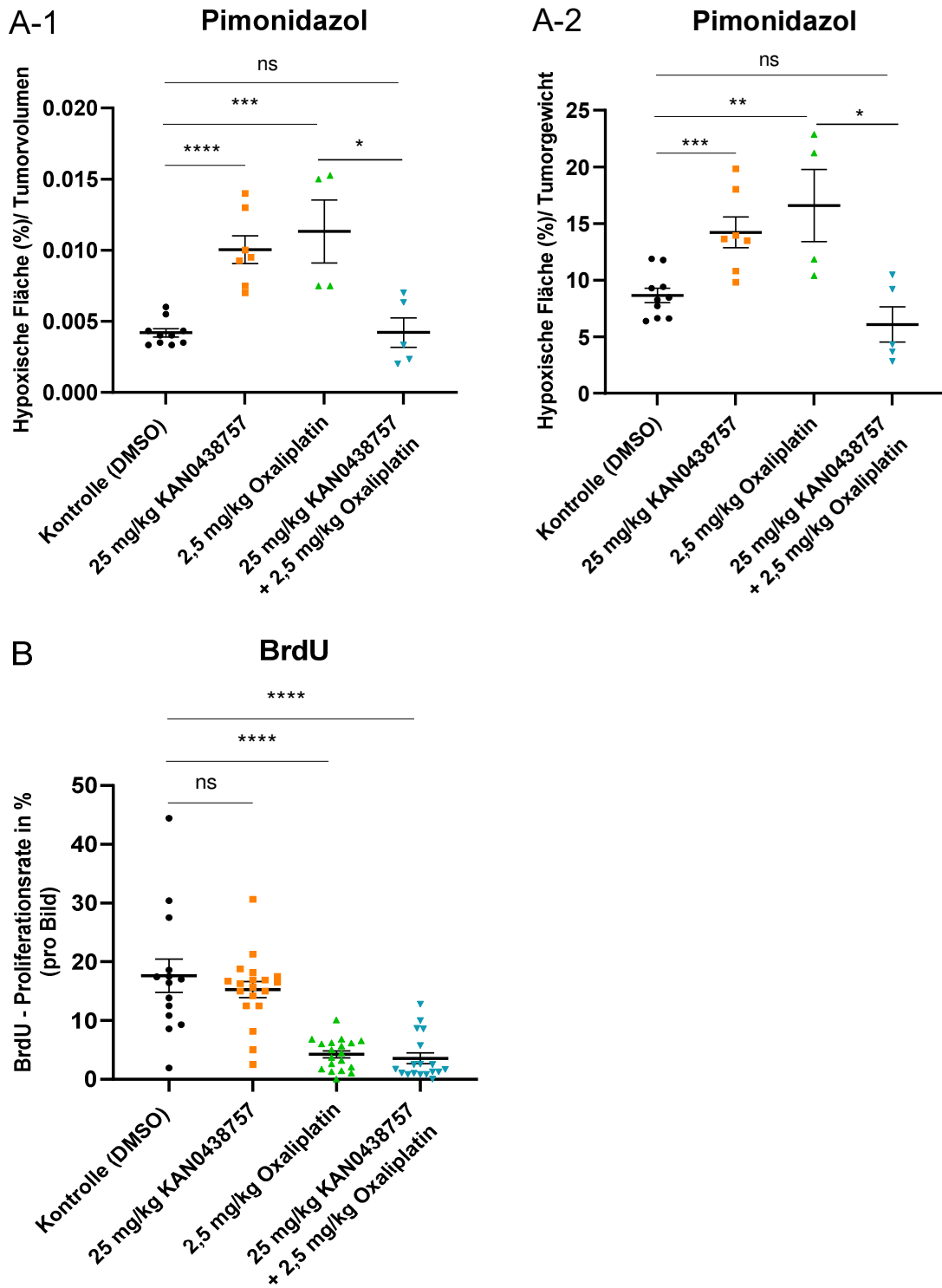


Abbildung 18: Effekte der PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 auf Sauerstoffversorgung und Zellproliferation in Tumoren A: Immunhistochemische Färbung mit Pimonidazol, zeigt den Anteil der hypoxischen Fläche in Prozent am Tumolvolumen (A-1) und am Tumorgewicht (A-2), Daten angegeben \pm SEM; B: Immunhistochemische Färbung mit BrdU zeigt die Proliferationsrate der Tumorzellen, Daten \pm SEM

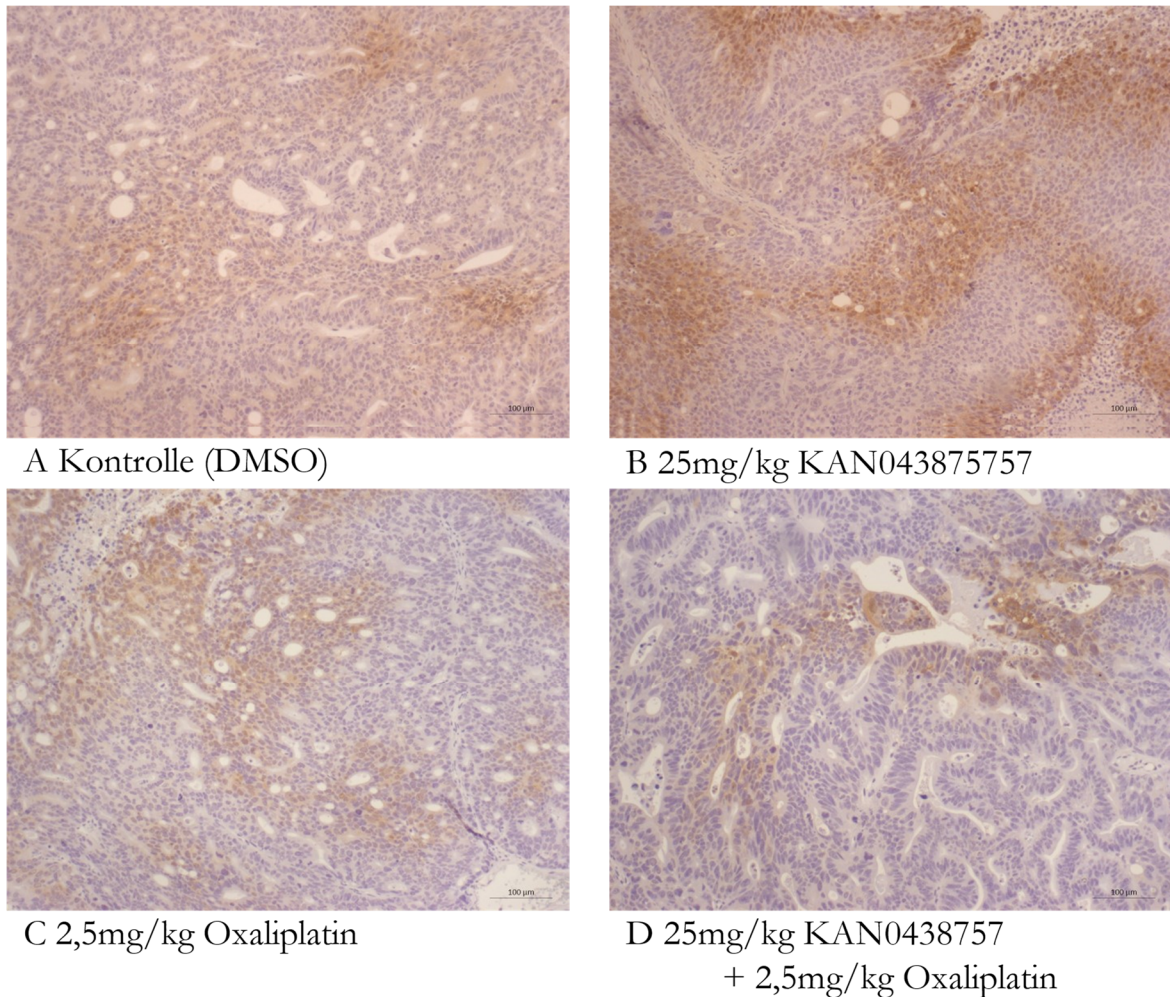
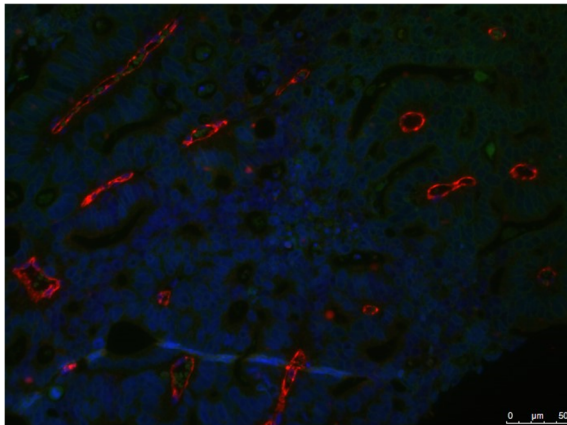


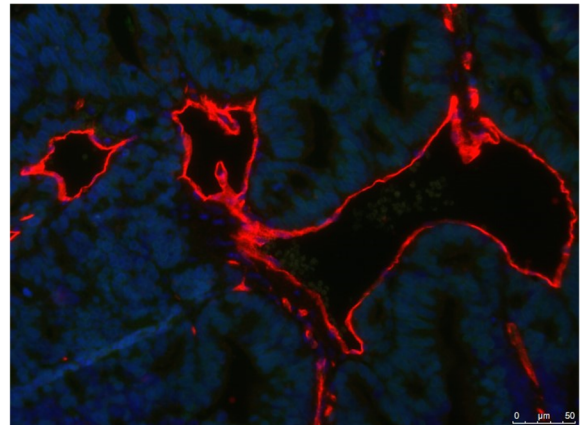
Abbildung 19: Behandlung mit Kombination aus Oxaliplatin und KAN0438757 reduziert hypoxische Areale Immunhistochemie mit Pimonidazol zeigt hypoxische Areale im Tumorgewebe nach Abschluss der Behandlung, repräsentative Bilder der verschiedenen Behandlungsgruppen A: Kontrollgruppe (DMSO), B: 25 mg/ kg KAN0438757, C: 2,5 mg/ kg Oxaliplatin, D: 25 mg/ kg KAN0438757 + 2,5 mg/ kg Oxaliplatin

Da die Proliferation abhängig sein kann von der Nähr- und Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes und PFKFB3-Inhibitoren bekanntlich Einfluss auf die Gefäßentwicklung im Tumor nehmen kann, untersuchten wir im nächsten Schritt die Tumolvaskularisierung. Dafür fertigten wir eine Endothelfärbung mit CD31 an. Repräsentative Bilder sind in der Abbildung 20 dargestellt. Anhand dieser Färbung untersuchten wir die Anzahl der Gefäße, die Fläche des Endothels, und die Lumina der Gefäße. In Abbildung 21 A ist zu erkennen, dass eine Behandlung mit KAN0438757 allein oder in Kombination mit Oxaliplatin einen deutlichen Trend zu geringeren Anzahlen an Gefäßen in den Tumoren zeigt. Die Fläche des Endothels ist in den mit Oxaliplatin allein behandelten Tumoren erhöht (Abbildung 21 B). Eine kombinierte Be-

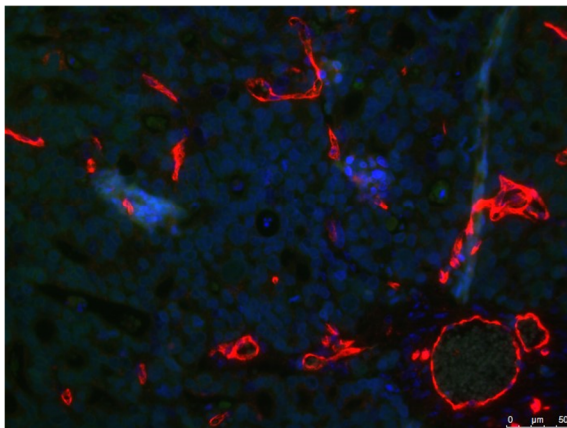
handlung mit KAN0438757 oder KAN0438757 allein beeinflusst die Fläche des Endothels im Vergleich zur Kontrollgruppe nur wenig. Die kumulierten Volumina der Gefäße pro Bild zeigen zwischen den Gruppen kaum bis keine Unterschiede, wie in Abbildung 21 C zu sehen ist. Im Vergleich der durchschnittlichen Lumina der Gefäße sind diese nach Behandlung mit Oxaliplatin kleiner als in der Kontrollgruppe. Die Gefäße in den KAN0438757 behandelten Tumoren zeigen einen leichten Trend der Zunahme der Lumina bei geringerer Anzahl der Gefäße (siehe Abbildung 21 D).



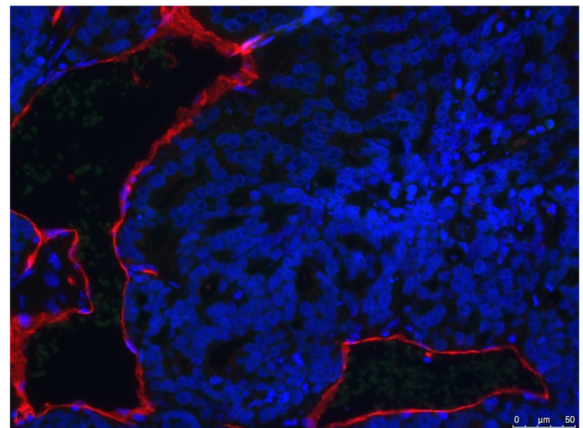
A Kontrolle (DMSO)



B 25mg/kg KAN0438757



C 2,5mg/kg Oxaliplatin



D 25mg/kg KAN0438757
+ 2,5mg/kg Oxaliplatin

Abbildung 20: Behandlung mit KAN0438757 führt zu Tumorgefäßnormalisierung Fluoreszenzimmunhistochemie mit CD31 (Endothel), Hoechst (Zellen) von Tumorgewebe nach Abschluss der Behandlung, repräsentative Bilder der verschiedenen Behandlungsgruppen A: Kontrollgruppe (DMSO), B: 25 mg/ kg KAN0438757, C: 2,5 mg/ kg Oxaliplatin, D: 25 mg/ kg KAN0438757 + 2,5 mg/ kg Oxaliplatin

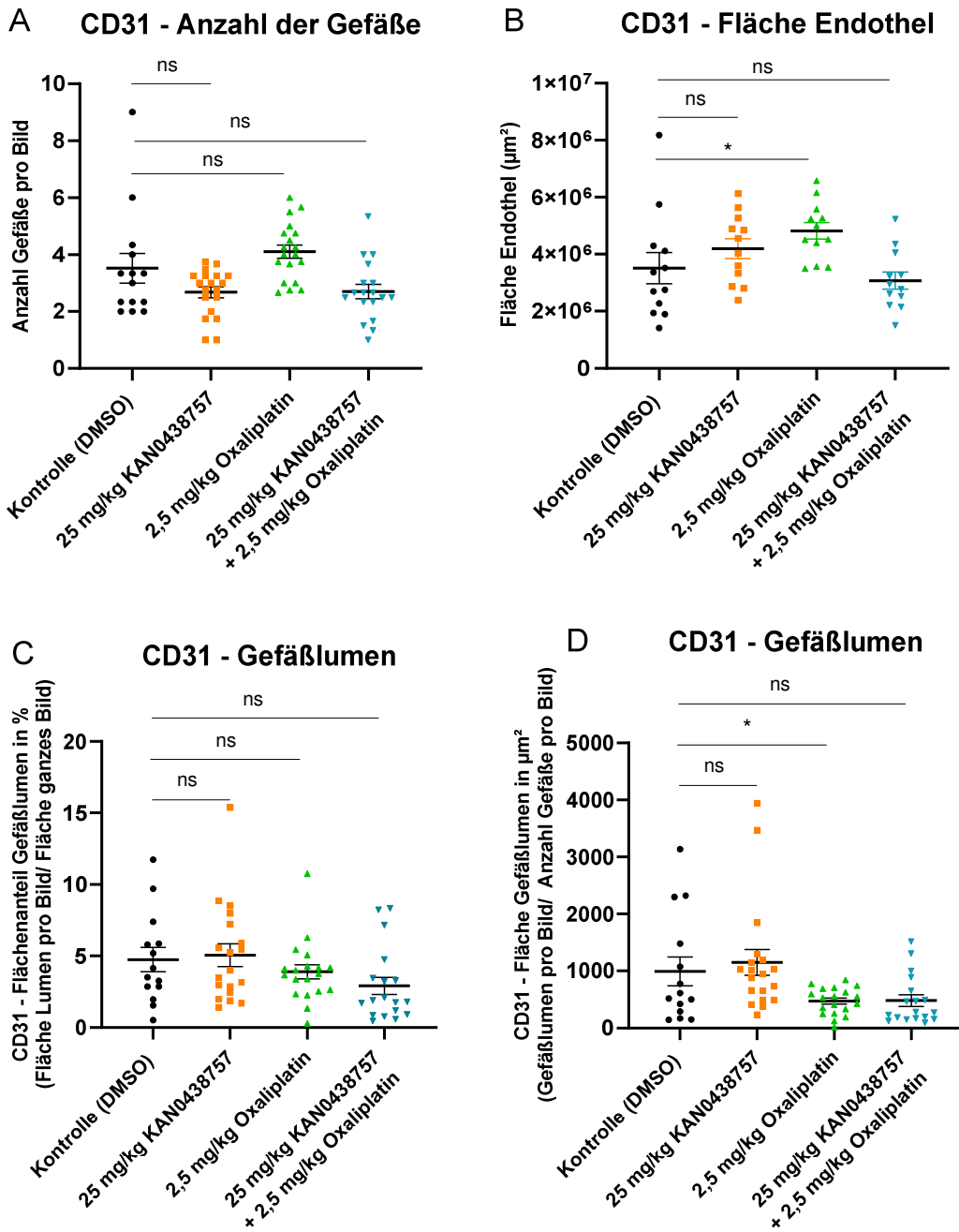


Abbildung 21: Effekte der PFKFB3 Inhibition mit KAN0438757 auf die Anzahl und Lumina der Tumorgefäße und das Endothel. Die Analyse der immunfluoreszenzchemischen Färbung des Endothels mit CD31 zeigt die Effekte der Behandlung mit KAN0438757 in A: auf die Anzahl der Gefäße pro Bild, in B: auf den Anteil der Fläche der Gefäßlumina am ganzen Bildausschnitt, in C: auf die Fläche der gesamten Gefäßlumina pro Bild in Relation zu der Anzahl der Gefäße im Bild, und in D: auf die durchschnittliche Fläche eines Gefäßlumens, Daten angegeben in \pm SEM.

4 Diskussion

KRK sind mit 18,1 Millionen neuen Fällen (2018) und 9,6 Millionen Sterbefällen (2018) die dritthäufigste Krebsart und zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache weltweit. (Bray et al. 2018) Die Entwicklung der Zahlen der Neuerkrankungen im Vergleich zu den Sterbefällen zeigte in den vergangenen 20 Jahren nur geringe Veränderungen. Die bisher etablierten Methoden zur Behandlung scheinen nicht ausreichend für einen langfristigen Therapieerfolg und führen nur für einige Patienten zur Heilung. (Krebs in Deutschland 2017) Da trotz der Früherkennungsprogramme viele Tumore erst in fortgeschrittenen Stadien erkannt werden und bereits 20% bei Diagnosestellung metastasiert sind, ist die Prognose meist schlecht. (Brenner et al. 2014) Die Fünf-Jahres-Überlebensrate sinkt mit zunehmendem Stadium. (Fibbe 2018) Weiterhin ist bekannt, dass die PFKFB3-Expression sowohl in Kolon- als auch in Rektumkarzinomen meist erhöht ist und die Expressionsrate negativ mit der Überlebensrate von Patienten mit KRK korreliert. (Oliveira et al. 2021) Daraus ergibt sich ein hohes Handlungspotenzial zur Entwicklung weiterer Therapieansätze vor allem im fortgeschrittenen Tumorstadium. Effektive und bereits bekannte Angriffspunkte dafür sind unter anderem die Angiogenese und die Glykolyse. Substanzen, die die Glykolyse beeinflussen, sind Teil der aktuellen Forschung mit vielversprechenden Ergebnissen. Jedoch ist bisher noch keine Substanz im klinischen Einsatz.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Evaluation eines neuen Inhibitors von dem glykolytischen Enzym PFKFB3, bei dessen Inhibition Effekte auf den Stoffwechsel der Tumorzellen und gleichzeitig auf die Angiogenese der Tumore gezeigt werden konnten. (Cantelmo et al. 2017; Conradi et al. 2017)

4.1 Humane Zelllinien als *In-vitro*-Modelle und PDX als *In-vivo*-Modelle

Bis eine neu entwickelte Substanz die Zulassung zur therapeutischen Behandlung in Patienten bekommt, wird sie in mehreren Phasen auf viele Eigenschaften und Wirkungen getestet. Die erste Phase erfolgt präklinisch zunächst *in vitro* und in Tiermodellen. Ziel ist dabei die Evaluation der Effizienz, der Toxizität und der Pharmakokinetik.

Zelllinien sind noch immer gut geeignete Modelle, um die wichtigsten Kennzeichen und Eigenschaften der Primärtumore zu repräsentieren. (Barretina et al. 2012; Linnekamp et al. 2018; Mouradov et al. 2014)

Wir haben die humanen kolorektalen Zelllinien HCT-116 und HT-29 gewählt, da sie zum einen unterschiedlichen Ursprungs sind. So sind HCT-116 aus einem Kolonkarzinom aus dem ascendierenden Bereich extrahiert und HT-29 aus einem kolorektalen Adenokarzinom eines weiter aboral liegenden Abschnittes. Zum anderen unterscheiden sie sich in verschiedenen Merkmalen wie z. B. molekularen Markern, Mutationsstadien und Expression von vaskulären Faktoren. (Balin-Gauthier et al. 2006; Morales et al. 2005; Mouradov et al. 2014; Pal et al. 2018; Park et al. 2019; Schneider et al. 2012) Die beispielhaft genannte Variabilität ist als Korrelat des individuellen Therapieansprechens und der Resistenzen zu verstehen, wie sie auch in der Klinik bei der Therapie von kolorektalen Karzinomen beobachtet werden. Sie stellen eine der großen Hürden in der Entwicklung neuer Therapeutika dar. Um bereits präklinisch den Einfluss dieser Differenzen auf mögliche Resistenzen und Reaktionen zu evaluieren, entschieden wir uns für diese beiden Zelllinien. Trotz vielversprechender Ergebnisse in *In-vitro*-Experimente, zeigt die Mehrheit an neu entwickelten Wirkstoffen keine ausreichende Wirksamkeit in Menschen. (DiMasi et al. 2013) Homogene Zelllinien können weder die Heterogenität der Tumoren vollständig wiedergeben noch die mikroskopische Tumorumgebung. Daher ergänzten wir unsere präklinische Evaluation durch *In-vivo*-Experimente mit PDX. Diese bieten den Vorteil, dass sie zum einen genomische, transkriptionelle und phänotypische Merkmale relativ genau über mehrere Passagen beibehalten und zum anderen die Architektur des Primärtumors, die Vaskularisierung und die Tumorumgebung nachahmen, welche das Tumorstadium, die Metastasierung und Resistenzen beeinflussen. (Brown et al. 2016; Julien et al. 2012; Gao et al. 2015)

4.2 Effekte von KAN0438757 *in vitro*

4.2.1 Morphologische Veränderungen und Apoptoseinduktion

Wie in Abbildung 12 dargestellt, verändern sowohl humane kolorektale Tumorzellen als auch humane Endothelzellen ihre Morphologie unter der Therapie mit KAN0438757. Es ist bekannt, dass der Zellmetabolismus und das Zytoskelett miteinander interagieren. Die glykolytische Aktivität kann sich als Antwort auf mechanische und architektonische Aspekte des Aktinzytoskeletts verändern. Andersherum betrachtet ist daher bei Veränderungen der Glykolyse auch von einem Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts auszugehen. So steuern Integrine und Cadherine z. B. adhäsive Eigenschaften. (Park et al. 2020) Wir konnten in allen Zelllinien beobachten, dass die Adhäsion durch KAN0438757 beeinträchtigt wurde, indem

sich die Zellen von der Gefäßoberfläche lösten und entweder als Einzelzellen oder kleinere Zellhaufen frei im Medium schwammen.

Weitere Veränderungen entsprechen den typischen Merkmalen der Apoptose, wie sie von Häcker (2000) beschrieben werden. Ab einer Konzentration von 50 μM KAN0438757 waren bei den Tumorzellen Vorwölbungen der Zelloberfläche (*Blebs*) deutlich erkennbar. Die Zellen wurden runder, schrumpften zusammen und lösten sich zum Teil aus dem Zellverband. Wir gehen daher davon aus, dass KAN0438757 Apoptose induzieren kann und die Mehrheit der kolorektalen Tumorzellen ab einer Konzentration von 50 μM nicht mehr lebendig sind. Eine Induktion von Apoptose konnte bereits durch PFKFB3-Inhibition mit *small interfering ribonucleic acid* (siRNA) in HeLa Zellen und durch PFK-15 in Zellen eines Magenkarzinoms gezeigt werden. (Zhu et al. 2016; Yalcin et al. 2014) Yalcin et al. (2014) konnten herausfinden, dass F-2,6-BP CDK1-abhängig die Phosphorylierung von p27 stimulieren und somit zu dessen Degradation führen kann. P27 ist ein Apoptoseaktivator. Durch Inhibition von PFKFB3 sinkt das Level von F-2,6-BP und die Aktivität von CDK1, sodass die Stimulation des Abbaus von p27 fehlt. In der Folge kommt es zu einer erhöhten Induktion von Apoptose. (Yalcin et al. 2014)

4.2.2 Zelltoxizität und Viabilität

Um die Lebendigkeit und Fähigkeit zu proliferieren genauer zu untersuchen, führten wir einen LDH-Assay und einen CTB-Assay durch. Die Ergebnisse des LDH-Assays für die Tumorzellen bestärken unsere Annahme, dass KAN0438757 ab einer Konzentration von 50 μM oder weniger zur Einleitung des Zelltodes führt. Die Ergebnisse der HUVECs waren für uns zunächst überraschend. PFKFB3 ist bekanntlich in Tumorzellen hochreguliert. (Atsumi et al. 2002; Cantelmo et al. 2016) Bei höherer Konzentration von PFKFB3 ist von einer stärkeren Abhängigkeit und somit stärkeren Reaktion auf Inhibition auszugehen. Gustafsson et al. (2018) zeigten in ihren Untersuchungen zu KAN0438757, dass der Inhibitor relativ selektiv für transformierte Zellen wirksam ist. Unsere Erkenntnisse zu den morphologischen Veränderungen, den Veränderungen im *xCELLigence*, im CTB-Assay und im Wundheilungsassay der HUVECs sind diesbezüglich jedoch inkonsistent. Zudem ist nachgewiesen, dass die Glykolyse auch in Endothelzellen hochreguliert ist. (Bock et al. 2013a; Bock et al. 2013b; Carmeliet and Jain 2011) Diese Tatsachen lassen die Ergebnisse des LDH-Assays für uns ungeklärt. Wir können lediglich spekulieren, dass nicht entartete und weniger proliferative Zellen weniger empfindlich auf die Inhibition reagieren. Die Inhibition könnte also in nicht ausreichend hoher Dosierung erfolgt sein, um Zelltod zu induzieren. Eine weitere Vermutung ist, dass

KAN0438757 zu einer Zellzyklusreduktion oder einer Verschiebung des Schwerpunktes von der Glykolyse auf einen alternativen Stoffwechselweg in HUVECs führt, die Zellen jedoch Mechanismen besitzen, die eine Erholung nach Behandlung zulassen. Um Limitationen oder unvorhersehbare und irreführende Ergebnisse des LDH-Assays, beispielsweise durch Eintreten des Zelltodes außerhalb des Beobachtungszeitraumes oder LDH-Degradation im Medium der Zellen, auszuschließen, sind ergänzende Versuche in komplexeren *In-vitro*-Systemen notwendig. In weiterführenden Experimenten mit *patient-derived-organoids* (PDOs) konnten wir unsere Hypothese stützen, dass KAN0438757 Tumorzellen angreift, dabei aber normale Zellen verschont. (Oliveira et al. 2021)

Eindeutiger sind dagegen die Ergebnisse aus dem CTB-Assay. Sie zeigen, dass KAN0438757 in allen Zelllinien zu einer Senkung der Viabilität führt. Tumorzellen weisen meist eine hohe Proliferationsrate auf, für die viel Energie benötigt wird. F-2,6-BP, welches durch PFKFB3 reguliert wird, könnte eine wichtige Kopplung zwischen einer ausreichenden Glykolyse und der Zellproliferation sein. (Yalcin et al. 2009) Wenn nicht genügend Energie durch Glykolyse produziert wird, die Zelle aber viel ATP im Zellzyklus verbraucht, würde das zu einer bedrohlichen Energieausbeute der Zelle führen und schließlich im Zelltod münden.

Durch die vermehrte Produktion von Nicotinamadeninucleotidphosphat (NADPH) während der Glykolyse kann außerdem über die Kontrolle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) hypoxischer Stress vermieden werden. (Ros and Schulze 2013) KAN0438757 könnte diesen Schutzmechanismus durch PFKFB3-Inhibition negativ beeinflussen, was schließlich auch zu einer vermehrten Apoptose leitet.

Yalcin et al. (2014) konnten herausfinden, dass p27 nicht nur zur Induktion von Apoptose führt, sondern auch den Zellzyklus beeinflusst, indem es zu einem Zellzyklusarrest in der G1/2 Phase führt. Dieser Mechanismus wird ebenso wie die Apoptose durch PFKFB3 Inhibition verstärkt. (Yalcin et al. 2014) Auch Sherr and Roberts konnten einen Zusammenhang von vermehrtem PFKFB3 speziell im Nukleus, einem erhöhten Gehalt an F-2,6-BP, in der Folge auch von CDK1 und der Proliferation feststellen. (Sherr and Roberts 1995) Dass KAN0438757 im Nukleus wirksam ist und die Biosynthese beeinflusst, wurde bereits von Gustafsson et al. (2018) nachgewiesen.

Eine verminderte Proliferation durch PFKFB3-Inhibition konnte außerdem in HeLa-Zellen, in Zellen von nasopharyngealen Karzinomen, Magenkarzinomen, Brustkrebs, Osteosarkomen und auch bereits durch Inhibition mit 3-PO in kolorektalen Adenokarzinomen gezeigt werden. (Zhu et al. 2016; Du et al. 2015; Ge et al. 2015; Klarer et al. 2014; Yalcin et al. 2014; Gu et al. 2017)

4.2.3 Invasions- und Migrationsverhalten

Der größte Handlungsbedarf bei der Verbesserung der Therapien von kolorektalen Karzinomen besteht vor allem in den fortgeschrittenen Stadien der Tumore. Die Prognose ist bedeutend schlechter beim Vorliegen von Metastasen. (Fibbe 2018) Wichtige Mechanismen für die Progression und Metastasierung von Tumoren stellen dabei die Invasion und Migration von Tumorzellen dar. (Yamaguchi et al. 2005; van Zijl et al. 2011) Sie sind bekannte Angriffspunkte in der Tumorthherapie, die durch den Zellmetabolismus beeinflusst werden. So konnten Chen et al. (2016) z. B. durch Inhibition von HIF-1- α eine Reduktion der Invasion und Migration von malignen Melanomzellen erzielen. HIF-1- α gilt als ein wichtiger Regulator der Glykolyse, indem er unter anderem als Transkriptionsfaktor die Expression von PFKFB3 beeinflusst. (Cordero-Espinoza and Hagen 2013; Obach et al. 2004)

Unsere Ergebnisse aus dem Wundheilungsassay und dem Invasions-Assay zeigen, dass KAN0438757 die Migration und Invasion ebenfalls effektiv hemmt. Bereits 10 μ M KAN0438757 zeigen Auswirkungen auf die Invasion, sodass der Einfluss durch eine Senkung der Proliferation und die Induktion von Apoptose auf diese Ergebnisse als minimal angesehen werden kann. Dabei scheinen HCT-116 etwas sensibler auf KAN0438757 zu reagieren als HT-29, bei denen eine etwas längere Behandlung oder höhere Konzentrationen benötigt werden, um die Migration signifikant zu beeinflussen. Eine Erklärung dafür könnten die Unterschiede im Mutationsstatus der Zelllinien sein, wie bereits in 4.1 angesprochen. So ist EGFR in HT-29 eher schwach exprimiert, in HCT-116 dagegen sehr stark. (Balin-Gauthier et al. 2006) EGFR ist in vielen weiteren Tumoren hochreguliert und wesentlich an der Induktion von Invasion und Migration beteiligt. (Lu et al. 2001) Wir spekulieren daher, dass eine höhere Expression von EGFR für einen vermehrten Drang zu Migration und Invasion sprechen könnte und somit eine Störung dieser Prozesse eher zu einer generellen Senkung führen kann. *Real-time*-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)-Analysen von Genen, die mit Migration und Invasion assoziiert sind wie z. B. PAXILLIN, VINCULIN, CORTACTIN und Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein-1 konnten für HUVECs zeigen, dass die mRNA-Expression nach Behandlung mit KAN0438757 signifikant gesenkt wurde. Für die Tumorzelllinien konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden. (Oliveira et al. 2021) Auch das Invasionsverhalten wird durch KAN0438757 in beiden kolorektalen Krebszelllinien signifikant gesenkt. Bereits 10 μ M KAN0438757 zeigen Wirkung, sodass der Einfluss durch eine Senkung der Proliferation und die Induktion von Apoptose auf diese Ergebnisse als minimal angesehen werden kann.–Die genauen Mechanismen und weitere beteiligte Proteine bleiben weiterhin nicht endgültig geklärt.

Durch Manipulation weiterer glykolytischer Enzyme konnte gezeigt werden, dass die Glykolyse einen wichtigen Einfluss auf Migration und Invasion hat und somit ein effektiver Angriffspunkt für neue Therapeutika darstellt. Die Epidermale-mesenchymale-Transition, welche ein notwendiger Schritt in der Migration und Invasion bis hin zur vollständigen Metastasenausbildung ist, wird beispielsweise durch das glykolytische Enzym Phosphoglucose Isomerase/ Autokriner Motilitätsfaktor (PGI/AMF) induziert. Ebenso wurde für weitere Enzyme wie Pyruvatkinase M2 (PKM2), LDH und Tumor-Wachstumsfaktor-Beta (TGF- β) gezeigt, dass durch deren Blockade das Migrationsverhalten verschiedener Krebszellen, insbesondere auch kolorektalen Ursprungs, gesenkt wird. (Han et al. 2013; Zhou et al. 2012)

Für PFKFB3 gibt es bereits Nachweise, dass dessen Inhibition mit einem Lentivirus in Brustkrebs und mit siRNA in Magenkrebs und kolorektalem Krebs zu einer Verminderung der Migration und Invasion führt. (Han et al. 2017; Peng et al. 2018; Han et al. 2016)

HUVECs zeigen ein sehr sensibles Verhalten gegenüber KAN0438757. Schon eine Behandlung mit 10 μ M KAN0438757 über 3 h zeigt signifikante Auswirkungen auf das Migrationsverhalten der Endothelzellen. Wie bereits erwähnt, ist auch in Endothelzellen die Glykolyse hochreguliert und PFKFB3 wird vermehrt exprimiert. (Bock et al. 2013a; Bock et al. 2013b; Carmeliet and Jain 2011)

Die Expression von PFKFB3 wird unter anderem wesentlich durch VEGF gesteigert. (Bock et al. 2013b; Xu et al. 2014). Allerdings erfolgt die Regulierung auch andersherum. Eine Inhibition von PFKFB3 führt zu einer verminderten Expression von VEGF. (Peng et al. 2018)

Dabei spielt PFKFB3 vor allem eine wichtige Rolle in der Progression und Migration der EC (vgl. 4.2.3) und in der Angiogenese (Bock et al. 2013a; Bock et al. 2013b; Carmeliet and Jain 2011; Beckert et al. 2006; Xu et al. 2014) Cantelmo et al. (2016) konnten für TEC zeigen, dass etwa 85% der ATP Moleküle über aerobe Glykolyse gewonnen werden. Dies stellt dahingehend einen Vorteil dar, dass TEC in sauerstoffarme Bereiche aussprossen und resistent gegen die heterogene Tumorumgebung sein müssen, um zu überleben. PFKFB3 ist dabei an der Steuerung der Aussprossung beteiligt. (Cantelmo et al. 2016) Sowohl in TEC als auch in nicht tumorösen EC wie HUVECs, ist für die Aussprossung die Ausbildung von Filopodia und Lamellipodia an den migrierenden EC, den sogenannten „*Tip-cells*“, notwendig. Diese sind reich an PFKFB3 und ATP und navigieren die Sprossung. „*Stalk-cells*“ dagegen sind hoch proliferativ und für die Elongation der Gefäße zuständig. Sie werden durch Notch reguliert – ein Faktor, der ebenfalls durch VEGF hochreguliert ist. (Bock et al. 2013b; Zecchin et al. 2017) Nach Inhibition von PFKFB3 konnte gezeigt werden, dass die Migration und Aussprossung der Gefäße dramatisch vermindert wird. (Xu et al. 2014).

Wie bereits in 1.1.6 beschrieben, gehören zu den aktuellen Therapien auch mehrere antiangiogene Metabolite. Inhibitoren gegen den bekanntesten Angiogenesefaktor und wichtigen Regulator von PFKFB3, VEGF, wurden bereits in vielen Studien getestet. Ein Erfolg bezüglich Verbesserung des Gesamtüberlebens konnte jedoch nur in Kombination mit Chemotherapie oder Radiotherapie verzeichnet werden und beschränkt sich auf einen Überlebensvorteil von fünf Monaten. (Jain 2014; Hurwitz et al. 2004). Mit dem bereits bekannten PFKFB3-Inhibitor PFK-15 konnten ebenfalls Einschränkungen in Migration und Ausbildung der Filopodia erzielt werden. (Li et al. 2017) Basierend auf diesen und unseren Ergebnissen der signifikant eingeschränkten Migration von HUVECS, lassen uns daher ein hohes Potenzial für KAN0438757 vermuten, die Tumorthherapie bezüglich Anti-Angiogenese zu verbessern und die Tendenz zur Metastasierung wesentlich zu reduzieren.

4.3 Effekte von KAN0438757 *in vivo*

4.3.1 Eignung für den Einsatz von KAN0438757 *in vivo*

Die vielversprechenden Ergebnisse der *in vitro* Experimente veranlassten uns dazu, erste Versuche in lebenden Organismen zu planen. Da der Inhibitor vorher noch nie in Lebewesen getestet wurde, war es notwendig, zunächst eine Dosistestung durchzuführen. Dabei sollten die Verträglichkeit und mögliche toxische Eigenschaften untersucht werden und eine angemessene therapeutische Dosierung festgelegt werden. Die Dosierung für die Toxizitätstestung ermittelten wir auf Basis unserer Ergebnisse der *In-vitro*-Experimente. Dabei zogen wir heran, dass 10 $\mu\text{mol/l}$ von KAN0438757 bei einer Molaren Masse von 470 g/ mol etwa 4,7 mg/ kg entsprechen. Zudem orientierten wir uns an Erfahrungen mit dem bereits bekannten PFKFB3-Inhibitor 3-PO. (Cantelmo et al. 2016; Conradi et al. 2017)

Wir wählten eine hohe, mittlere und eine niedrige Dosierung. Mit der niedrigen Dosierung wollten wir testen, ob trotz der hohen Stoffwechselaktivität der Mäuse noch eine Wirkung erzielt werden kann. Mit der hohen Dosierung sollte eine definitive Wirkung sichergestellt werden und toxische Folgen durch eine Überdosierung evaluiert werden.

Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig eine gute Verträglichkeit des neuen Inhibitors. Sogar die hohe Dosierung verursachte keine toxischen Nebenwirkungen. Wir untersuchten speziell Leber und Nieren, die als wesentliche Entgiftungsorgane den Abbau von den meisten Medikamenten koordinieren. Auch dort waren sowohl in den Stoffwechselfparametern als auch histologisch keine Auffälligkeiten zu verzeichnen. Lunge und Herz als elementar lebenswichtige Organe wurden ebenfalls nicht in ihrer Funktion und Histologie beeinflusst. Atem- und Herz-

frequenz waren unter Beobachtung in allen Kohorten vergleichbar und unauffällig. Das Blutbild zeigte keine Veränderungen, ebenso wenig fanden wir toxische Auswirkungen auf den Intestinaltrakt. Diese beiden Systeme sind bekanntlich aufgrund ihrer schnell proliferierenden Gewebe und Zellen sehr sensibel gegenüber Chemotherapie. So stellen eine Zytopenie oder Mukositis oft limitierenden Faktoren in der Therapie dar. (Joanne M. Bowen et al. 2006; Keefe and Gibson 2007; Crawford et al. 2004) Wir schlossen daraus, dass KAN0438757 *in vivo* gut toleriert wird und sich für weitere therapeutische Einsätze eignet.

4.3.2 Chemosensibilisierung mit KAN0438757

Die Toxizitätstestung in C57BL6/N zeigte eine gute Toleranz und keine sichtbaren Auswirkungen auf den murinen Organismus. Für den Einsatz in den PDX-Modellen wählten wir die mittlere Dosierung von 25 mg/ kg KG KAN0438757. *In vitro* entspricht dies etwa einer Konzentration von 50 μ M. Jedoch muss in lebenden Organismen beachtet werden, dass die Wirksamkeit durch metabolischen Abbau und die Pharmakokinetik beeinflusst wird. So kann der Wirkstoff zu einem Teil bereits metabolisiert werden, bevor er wirksam wird. (Zhang et al. 2012) 25 mg/ kg KG KAN0438757 ist also als eine niedrige Dosierung *in vivo* zu bezeichnen. Ziel der Behandlung mit KAN0438757 ist eine Sensibilisierung für Chemotherapeutika. Wir wählten Oxaliplatin, ein Platinderivat, welches seit den 2000ern in der Standardtherapie kolorektaler Karzinome eingesetzt wird. (André et al. 2009; Gramont et al. 2000) Es ist wirksamer und sicherer als das ältere Cisplatin. Platinderivate interagieren mit zellulärer DNA, führen zu Addukten und stören somit die Replikation und Transkription. (Graham et al. 2004) Dies führt zur Inhibition von Zellproliferation und Migration und Induktion von Apoptose. (Yan et al. 2019) Yan et al. (2019) konnten kürzlich zeigen, dass unter Behandlung mit Oxaliplatin die Expression von PFKFB3 gesteigert wird. PFKFB3 scheint also an Zellschutzmechanismen beteiligt zu sein. Durch eine gesteigerte Glykolyse konnten DNA-Schäden effektiver beseitigt werden, die durch Cisplatin verursacht wurden (Li et al. 2018). Eine Inhibition von PFKFB3 mit PFK-15 führte dagegen zur Verstärkung der Wirksamkeit von Oxaliplatin in kolorektalen Karzinomen. (Yan et al. 2019) Auch wir konnten in *In-vivo*-Experimenten zeigen, dass eine Kombination aus KAN0438757 und Oxaliplatin einen Trend zur Potenzierung der Toxizität von Oxaliplatin bezüglich der Wirksamkeit zeigt, jedoch nicht die unerwünschten Nebenwirkungen verstärkt. Die Tiere nahmen nur wenig an Gewicht ab. Dabei gab es keine Unterschiede zwischen der Gruppe, die mit Oxaliplatin allein und mit KAN0438757 behandelt wurden. Die Diarrhoen sind bekannte Nebenwirkungen von Oxaliplatin. (Haller 2000)

Wir führten sie nicht auf KAN0438757 zurück. Die Mäuse erholten sich in den behandlungsfreien Tagen schnell wieder, sodass dies keine Limitation der Behandlung darstellte.

Wir vermuten, dass die Behandlung mit Oxaliplatin für 48 h zu kurz war, als dass eine Erhöhung der Expression von PFKFB3 eintreten konnte und dessen Inhibition durch KAN0438757 die Wirksamkeit so sehr verstärkt, dass die Wachstumsinhibition signifikante Unterschiede ergeben konnte. Eine Vorbehandlung mit Oxaliplatin allein könnte die PFKFB3 Expression zunächst erhöhen, wie es auch Yan et al. (2019) zeigte, sodass KAN0438757 mehr Angriffsfläche hätte. Eine Vorbehandlung mit KAN0438757 allein über einen längeren Zeitraum könnte die Tumorgefäße weiter normalisieren und somit den Zugang für anschließende Chemotherapie zum Tumor noch weiter verbessern. Auch ein längerer Beobachtungszeitraum nach Behandlungsende oder bei guter Toleranz weitere Behandlungszyklen wären mögliche Ansätze, um die Effektivität der Kombinationstherapie zu verbessern. Dies könnten interessante nächste Schritte für zukünftige Untersuchungen sein.

Eine andere Vermutung ist, dass die Konzentration von Oxaliplatin bereits so hoch gewählt ist, dass dessen Wirksamkeit allein bereits so stark war, sodass sich eine Wirkverstärkung kaum noch auswirken konnte.

4.3.3 Effekte von KAN0438757 auf das Tumorwachstum und Proliferation

Die Kombinationstherapie testeten wir schließlich *in vivo* in murinen PDX und konnten eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums mit Oxaliplatin und KAN0438757 in Kombination mit Oxaliplatin erreichen. Leider war auch hier der Unterschied zwischen Oxaliplatin und der Kombinationsbehandlung nicht signifikant. Der Trend ist jedoch gut zu erkennen. Durch KAN0438757 allein konnte das Wachstum nur wenig verlangsamt werden. Basierend auf den Versuchen mit den bekannten PFKFB3-Inhibitoren 3-PO und PFK-15 in vergleichbaren Dosierungen von 25 mg/ kg, vermuteten wir bei dieser eher niedrigen Dosierung von KAN0438757 keine signifikante Wachstumsinhibition. (Cantelmo et al. 2016; Zhu et al. 2016) So zeigten Cantelmo et al. (2016), dass eine Behandlung mit 25 mg/ kg 3-PO zu keiner signifikante Wachstumsinhibition in murinen Xenografts aus Melanomzellen führt. Zhu et al. (2016) verwendeten den 100fach potenteren PFKFB3-Inhibitor PFK-15 in derselben Konzentration in Xenografts aus Adenokarzinomzellen des Magens. Diese, im Vergleich als deutlich stärker zu bewertende, Inhibition führte schließlich zu einem verlangsamteten Tumorwachstum. Wie bereits benannt, zeigten auch unsere *In-vitro*-Experimente erst ab 50 μ M KAN0438757 eine höhere Zelltodrate und Hemmung der Viabilität für die Tumorzelllinien. Die immunhistochemische Untersuchung mit BrdU bestärken diese Annahme. Die Prolifera-

tionsrate wird mit Oxaliplatin allein und in Kombination mit KAN0438757 deutlich gesenkt. 25 mg/ kg KG KAN0438757 allein dagegen zeigt keine signifikante Hemmung der Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die verminderte Proliferationsrate könnte durch eine mangelhafte Nähr- und Sauerstoffversorgung bedingt sein. Wir wissen jedoch, dass Tumorzellen ihren Stoffwechsel so umstellen können, dass sie in hypoxischen Konditionen gut überleben können. Unsere Ergebnisse der Immunhistochemie mit Pimonidazol weisen deutlich darauf hin, dass durch die Kombinationsbehandlung signifikant weniger hypoxische Areale im Tumorgewebe vorhanden sind. Der signifikante Unterschied zwischen der Behandlungsgruppe mit Oxaliplatin allein und der Kombinationsbehandlung legt nahe, dass dies auf KAN0438757 zurückzuführen ist. (siehe Abbildung 18). Repräsentative Bilder in Abbildung 19 verdeutlichen dies. In Relation zum Tumorgewicht und Tumolvolumen, sind die Areale vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Mit KAN0438757 und Oxaliplatin jeweils allein ist der Tumor jedoch deutlich hypoxischer. Nekrotische Areale wurden bei der Analyse ausgeschlossen. Dabei konnten wir beobachten, dass die kleineren Tumore aus der Gruppe mit Oxaliplatin und mit der Kombinationsbehandlung mehr nekrotische Areale aufwiesen, was zu der bereits benannten niedrigeren Proliferationsrate passt. Die Beobachtungen sind als repräsentative Bilder in Abbildung 17 dargestellt.

4.3.4 KAN0438757 führt zu Tumorgefäßnormalisierung

Wir vermuten, dass die verminderte Proliferation und vermehrte Nekrose durch eine verstärkte Wirkung von Oxaliplatin bedingt sein könnte. Für den PFKFB3 Inhibitor 3-PO konnten Cantelmo et al. (2016) zeigen, dass es durch eine niedrige Dosierung zu einer Tumorgefäßnormalisierung kommt. Hypoxie bedeutet, dass die Zellen nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. Da die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch Blutgefäße gesichert wird, spricht dies für eine inadäquate Blutgefäßausbildung oder nicht optimale Perfusion durch die bestehenden Gefäße vor allem in den Tumoren, die mit KAN0438757 und Oxaliplatin allein behandelt wurden. Andersherum gesagt, könnte eine Kombinationsbehandlung aus Oxaliplatin und KAN0438757 eine bessere Gefäßversorgung bedingen. Denn es ist bekannt, dass Tumorgefäßnormalisierung den Anteil hypoxischer Areale verringert und dazu führt, dass Chemotherapeutika den Tumor besser erreichen können. (Cantelmo et al. 2017) Wie wir in unseren *In-vitro*-Experimenten bereits zeigen konnten, reagieren die hoch glykolytischen EC (HUVECs) sensibler auf die PFKFB3-Inhibition mit KAN0438757. Cantelmo et al. (2016) fanden dies bereits für 3-PO heraus. Während 25 mg/ kg 3-PO das Tumorwachstum nicht beeinflusste, hatte diese Dosierung sehr wohl Einfluss auf EC, vor allem TEC. Sie wie-

sen eine verstärkte vaskuläre Barriere und größere Gefäßlumina nach. Die Konzentration führte nicht zu vermehrter Apoptose der EC. Es konnten so aber eine Tumorzellinvasion und Metastasierung effektiv reduziert werden. (Cantelmo et al. 2016; Conradi et al. 2017) Unsere Analysen ergaben nach Therapie mit KAN0438757 allein oder in Kombination mit Oxaliplatin eine geringere Anzahl an Blutgefäßen. In der Auswertung der Immunfluoreszenz für CD31, zeigte sich die Endothelfläche größer bzw. vergleichbar mit der Endothelfläche in der Kontrollgruppe mit mehr Gefäßen. Daraus schließen wir, dass die wenigen einzelnen Gefäße eine dichtere Endothelschicht haben, was beispielhaft in den repräsentativen Bildern in Abbildung 20 dargestellt ist. Zudem sind bei einer kleineren Tumorgroße weniger Gefäßen zu erwarten. Das Gewebe kann über kurze Distanzen per Diffusion ernährt werden. Wir konnten außerdem zeigen, dass die Gefäßlumina in den Tumoren, die mit Oxaliplatin behandelt wurden, signifikant kleiner waren. KAN0438757 scheint die Lumina wider unseres Erwartens wenig zu beeinflussen. Nur einzelne Tumorabschnitte sind nach Behandlung mit KAN0438757 mit größeren Gefäßen versehen. Die Differenz und Kontinuität sind jedoch nicht ausreichend, um einen signifikanten Unterschied aufzuzeigen.

Wie im Ergebnisteil in 3.1.1 beschrieben, scheint die Wirksamkeit von KAN0438757 etwas höher zu sein als die von 3-PO, sodass 25 mg/ kg möglicherweise die Grenze zwischen tumorgefäßnormalisierender Wirkung überschritten hat und bereits seine zelldestruierenden Effekte und gefäßdesintegrierende Wirkung entfaltet, wie es bei hohen Konzentrationen von 3-PO zu beobachten ist. (Conradi et al. 2017) Dies ist jedoch eine sehr spekulative Vermutung. Sie liegt nahe, da die Proliferation von HUVECs *in vitro* bereits ab 5 μ M KAN0438757 signifikant reduziert wurde. Bei einer umgerechnet etwa 10fach höhere Konzentration erwarten wir zytotoxische Auswirkungen, die bis zum Zelltod führen können. Wie bereits beschrieben, ergaben die *In-vitro*-Experimente mit HUVECs überraschenderweise anderes und auch unsere Auswertung der *In-vivo*-Experimente liefern keine eindeutigen Hinweise, um die Vermutung zu bestätigen. Zur genauen Evaluation sollte daher eine Testung mit geringerer Konzentration an KAN0438757 angestrebt werden. Solch weiterführende Experimente liegen jedoch außerhalb des möglichen Zielbereichs dieser Arbeit.

Tumorgefäßnormalisierung ist eng gekoppelt mit immunstimulatorischen Mechanismen, bei denen vor allem CD4⁺-T₁-Helferzellen (TH₁) und die Sekretion von Interferon-Gamma (IFN- γ) beteiligt sind. (Tian et al. 2017) Tian et al. (2017) zeigten erst kürzlich, dass Tumoren aus immunkompetenten Menschen in immundefizienten Mäusen einen schlechteren Gefäßstatus aufwiesen. Sowohl *in vitro* mit CD4-*Knock out* (CD4-KO) Zellen als auch *in vivo* in immundefizienten murinen PDX von Mammakarzinomen ist die Gefäßnormalisierung gestört. Eine

nachträgliche Infusion von TH₁-Zellen in die tumortragenden Mäuse reduzierte hypoxische Areale und führte zu dichteren Gefäßen. Auffällig war ein Nicht-Ansprechen auf TH₁-Infusion bei niedriger VEGF-Expression der Tumore.

Für die PDX verwendeten wir immundefiziente NOD-SCID-Mäuse. Sie haben keinen Thymus und besitzen somit keine CD4⁺-TH₁-Zellen. Andernfalls würden sie das humane Tumorgewebe abstoßen. Basierend auf den Erkenntnissen von Tian et al. (2017) stellten wir uns die Frage, inwieweit KAN0438757 in den von uns gewählten Mäusemodellen überhaupt gefäßnormalisierende Wirkung erreichen kann. Die gering ausgeprägten Unterschiede aus den KAN0438757 behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe bzw. der Oxaliplatinallein Gruppe könnten auf die fehlende Regulation der nicht vorhandenen CD4⁺-TH₁ Zellen zurückgeführt werden. Nur eine nachträgliche Infusion von TH₁-Zellen oder Experimente mit immunkompetenten tumortragenden Tiermodellen würde diese Frage klären. Es stellt jedoch einen wichtigen Aspekt für die zukünftige Untersuchung der Wirksamkeit und Effektivität *in vivo* von KAN0438757 dar.

4.4 Fazit und Ausblick

Abschließend sollen die zu Beginn gestellten Fragen und Hypothesen noch einmal aufgegriffen und beantwortet werden.

Tabelle 16: Ziele der Dissertation - Antwort

Nummer	Fragestellung/ Hypothese	Antwort
1.	Welchen Effekt zeigt KAN0438757 <i>in vitro</i> auf Zellproliferation, Migration und Invasion?	Wir konnten zeigen, dass KAN0438757 <i>in vitro</i> in hoher Dosierung ab 50 µM die Zellproliferation, Viabilität und Migration von Tumorzellen senkt. Die Invasionsrate wird bereits bei niedrigeren Konzentrationen vermindert.
2.	Welche Toxizität zeigt KAN0438757 <i>in vivo</i> und welche Dosis können wir zu therapeutischen Zwecken nutzen?	KAN0438757 zeigt in ersten Versuchen <i>in vivo</i> mit 25 mg/ kg KG KAN0438757 sowohl keine Akuttoxizität als auch langfristig keine toxischen Effekte.
3.	KAN0438757 nimmt in niedriger Dosierung allein keinen Einfluss auf das Tumorumfang?	Nach einer Behandlung mit 25 mg/kg KAN0438757 allein konnten wir keine signifikanten Unterschiede der Tumorumfänge

	men.	im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Auch die Proliferationsrate zeigt keine signifikanten Unterschiede auf.
4.	KAN0438757 führt in niedriger Dosierung zu Tumorgefäßnormalisierung,	Nach Behandlung mit KAN0438757 allein haben die Gefäße ähnlich große Lumina mit einer Tendenz zu größeren Lumina im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei einer geringeren Anzahl an Gefäßen, sind die Gefäße nach Behandlung mit KAN0438757 von einem dichteren Endothel umgeben.
5.	Zeigt KAN0438757 synergistische Effekte mit Chemotherapie oder eine Chemosensibilisierung?	Tendenzen zur Chemosensibilisierung sind z. B. an den kleineren Tumorumfängen nach Kombinationsbehandlung aus KAN0438757 und Oxaliplatin erkennbar, ebenso an der niedrigeren Proliferationsrate der Tumorzellen. Es sollten Versuche mit weiteren Kombinationen und Dosierungen ergänzt werden.

KAN0438757 stellt sich bereits *in vitro* als ein vielversprechender Inhibitor von PFKFB3 dar. Bei fehlender *In-vivo*-Toxizität eignet es sich gut zum Einsatz in Lebewesen. Auch dort konnten bisher wegweisende und erfolgreiche Ergebnisse in den Versuchen erzielt werden, was es zu einem interessanten Ansatzpunkt für weitere Erforschung macht und auch in unserer Arbeitsgruppe weiter bearbeitet wird. Es soll ein kurzer Ausblick über weitere mögliche Experimente und Ansatzpunkte gegeben werden.

Um die Reliabilität unserer Erkenntnisse zu verstärken, sollten die bereits durchgeführten Experimente mit weiteren Tumoren kolorektalen Ursprungs in größeren Kohorten wiederholt werden. Ebenso könnten zukünftig die Dosierungen des Inhibitors und von Oxaliplatin zu höheren oder niedrigeren Dosierungen variiert und die Behandlungszeiträume elongiert werden bzw. um weitere Zyklen ergänzt werden. Weitere interessante Versuche schließen Kombinationen auch mit anderen Chemotherapeutika, wie z. B. 5-FU ein.

Wie bereits in 4.3.4 angesprochen, ist für die Gefäßentwicklung das Immunsystem relevant. So könnten in zukünftigen Experimenten humanisierte Mäuse genutzt werden, die Komponenten

des Immunsystems von dem Patienten in sich tragen, von welchem auch der implantierte Tumor stammt.

Die von Gustafsson et al. (2018) beschriebene radiosensibilisierenden Eigenschaften von KAN0438757 machen ganz besonders die weitere Erforschung des Inhibitors in Kombination mit Radiotherapie interessant. Unsere Analysen der hypoxischen Areale haben ergeben, dass die Kombinationsbehandlung aus KAN0438757 mit Oxaliplatin die Hypoxie signifikant senkt. Somit könnte durch KAN0438757 die Wirksamkeit der Strahlentherapie erhöht werden, da zum einen bekannt ist, dass Hypoxie wesentlich zu Radioresistenz beiträgt. (Rockwell et al. 2009) Zum anderen konnten Gustafsson et al. (2018) zeigen, dass PFKFB3 vermehrt in bestrahltem und radioresistentem Gewebe vorhanden ist. Eine Hemmung mit KAN0438757 führte dazu, dass die homologe Rekombination zur Reparatur der strahlungsinduzierten DNA-Schäden gestört wurde. (Gustafsson et al. 2018) Eine weitere Vermutung ist, dass durch Gefäßnormalisierung unter anderem VEGF-Inhibitoren und EGFR-Inhibitoren, die Tumorzellen besser erreichen können und ihre radiosensibilisierenden Eigenschaften gezielter wirksam werden. (George et al. 2019) Ebenso zeigten Gustafsson et al. (2018) die Wirksamkeit von KAN0438757 auf andere Tumorentitäten. Um das Behandlungsspektrum des Inhibitors potenziell zu erweitern, ist es sinnvoll mit zukünftigen Experimenten Effekte auf Tumoren anderen Ursprungs wie z. B. Pankreas und Magen detaillierter zu evaluieren.

Alles in Allem zeigt der Inhibitor KAN0438757 also ein großes Potenzial für den klinischen Einsatz, weshalb es erstrebenswert ist noch weitere Analysen durchzuführen.

5 Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome sind weltweit die dritthäufigste Krebsart und stellen die zweithäufigste Ursache für krebsassoziierte Todesfälle dar. Durch verschiedene Screeningmethoden wird eine Früherkennung ermöglicht. Trotz dieser Früherkennungsmaßnahmen weisen etwa 25% der Patienten bereits bei Diagnosestellung Metastasen auf. Die Therapie der Wahl besteht aus der radikalen chirurgischen Resektion. Ab Stadium II mit Risikofaktoren wird eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU, Leukovorin und Oxaliplatin empfohlen. Bei Rektumkarzinomen besteht die Erstlinientherapie zusätzlich aus einer neoadjuvanten Radiochemotherapie. In der klinischen Behandlung metastasierter Karzinome (Stadium IV) finden Antikörper und Inhibitoren verschiedener Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise VEGF, EGFR, große Anwendung. Leider kommt es im Verlauf der Erkrankung oft zur Entwicklung von Resistenzen gegen die bereits etablierten Therapien, sodass es sich als notwendig herausstellt, neue therapeutische Angriffspunkte zu finden und weitere Inhibitoren zu entwickeln.

Einen solchen neuen Angriffspunkt stellt das glykolytische Enzym PFKFB3, dar. In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Glykolyse in Tumorzellen, Endothelzellen und Tumorendothelzellen hochreguliert ist und PFKFB3 dort vermehrt exprimiert wird. Eine höhere Glykolyserate kann den Tumorzellen unter anderem einen Wachstumsvorteil verschaffen und den Endothelzellen eine Gefäßausprossung in hypoxischen Bereichen ermöglichen. Die Tumorgefäße sind jedoch durchlässiger, ungeordnet und instabil. Zudem scheint PFKFB3 an der homologen Rekombination beteiligt zu sein, die eine wichtige Rolle in der Reparatur strahlenassoziiierter DNA-Schäden spielt

Die Inhibition von PFKFB3 bietet einen interessanten Angriffspunkt, um die Tumervaskularisierung zu beeinflussen und Tumorzellen möglicherweise direkt anzugreifen. Erfolgsversprechende Ergebnisse zeigten *In-vitro* und *In-vivo* Experimente mit dem Inhibitor 3-PO.

In der vorliegenden Dissertation wurde der neu entwickelte PFKFB3-Inhibitor KAN0438757 *in vitro* an kolorektalen Krebszelllinien (HT-29 und HCT-116) und Endothelzellen (HUVECS) in Bezug auf Effektivität auf die Morphologie, Proliferation, Viabilität, Invasions- und Migrationsfähigkeit der Zellen und Zelltoxizität evaluiert. Zudem wurde die Verträglichkeit *in vivo* in verschiedenen Dosierungen an tumorfreien immunkompetenten murinen Tiermodellen getestet. Ergänzend erfolgten erste therapeutische Experimente in tumortragenden murinen Xenografts, um die Auswirkungen auf das Tumorstadium und die Tumorgefäße zu untersuchen. Die *In-vitro*-Experimente zeigen eine konzentrationsabhängige Senkung der Zellviabilität, Proliferations- und Reduktionsfähigkeit nach Behandlung mit KAN0438757 in allen drei Zelllinien und konzentrationsabhängige Veränderungen der Morphologie und Senkung der Migra-

tionsrate. HUVECS werden dabei bereits durch niedrige Konzentrationen von 5 bis 10 μM KAN0438757 beeinflusst. Bei den Tumorzellen reagieren HCT-116 sensibler bereits auf 10 bis 25 μM , HT-29 erst ab 25 bis 50 μM signifikant auf die PFKFB3-Inhibition durch KAN0438757. Eine relevante Erhöhung der Zelltodrate konnte nur bei den Tumorzellen gesehen werden. Die Zelltodrate der Endothelzellen wurde nicht signifikant beeinflusst. Um Limitationen des Assays als Ursache der Ergebnisse auszuschließen, sollte der Zelltod in komplexeren *In-vitro*-Systemen weiterhin untersucht werden.

Interessanterweise wird die Invasionsfähigkeit der Tumorzellen HCT-116 und HT-29 bereits durch niedrigere Konzentrationen von 10 μM KAN0438757 signifikant gesenkt, sodass die Senkung unabhängig von der Proliferationsfähigkeit ist.

Erste Untersuchungen des Inhibitors *in vivo* in verschiedenen Dosierungen ergaben weder akut noch in langzeitiger Behandlung eine relevante Toxizität. KAN0438757 eignet sich daher gut für den Einsatz in Lebewesen. Für erste therapeutische Einsätze wurde eine niedrige Dosierung von 25 mg/kg KG gewählt und die Effektivität von KAN0438757 allein und in Kombination mit Oxaliplatin evaluiert. Es kann gezeigt werden, dass KAN0438757 allein das Tumorstadium nicht signifikant beeinflusst. Die immunhistochemischen Analysen der Tumorgewebe zeigen jedoch eine signifikant erhöhte Rate an hypoxischen Arealen ($p < 0,0001$) bei einer Proliferationsrate, vergleichbar mit der Kontrollgruppe. In Kombination mit Oxaliplatin ist die Rate an hypoxischen Arealen ähnlich der Kontrollgruppe, jedoch ist die Proliferationsrate der Tumorzellen signifikant vermindert ($p < 0,00001$). Die immunhistochemischen Untersuchungen der Tumorgefäße zeigen nach Behandlung mit KAN0438757 allein Tendenzen zu einer geringeren Anzahl an Gefäßen bei dichterem Endothel und größeren Lumina. Für signifikante Aussagen bedarf es weiterer Wiederholungen und Variationen der durchgeführten Experimente.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen die effektive Wirksamkeit des neuen Inhibitors sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf Tumor- und Endothelzellen. Bei fehlender systemischer Toxizität im lebendigen Organismus, eignet sich KAN0438757 gut für den therapeutischen Einsatz. Die gezeigten Ergebnisse weisen auf chemosensibilisierende Eigenschaften durch Tumorgefäßnormalisierung hin. Dies macht den Inhibitor zu einem interessanten Target für Kombinationen mit anderen bereits etablierten Chemotherapeutika, um deren Wirksamkeit zu erhöhen oder Therapieresistenzen zu umgehen. Im Hinblick auf bereits gezeigte radiosensibilisierende Eigenschaften des Inhibitors, sind auch zukünftige Untersuchungen von Kombinationsbehandlungen mit Radiotherapie erstrebenswert.

6 Anhang

In dieser Arbeit wurde aus Gründen der besseren Lesbarkeit und des Textflusses bei personenbezogenen Substantiven und Bezeichnungen hauptsächlich die männliche Form verwendet. Es sind selbstverständlich stets alle Geschlechter gemeint. Auf die Gleichberechtigung und Gleichstellung dieser sei daher im Besonderen hingewiesen. Durch den Verzicht auf Gendern soll keine Wertung impliziert werden.

Tabelle A1: Gradeinteilung nach WHO

Grad	
GX	Grad der Differenzierung kann nicht bewertet werden
G1	Gut differenziert
G2	Moderat differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Gradeinteilung nach histopathologischem Differenzierungsgrad; Tabelle modifiziert nach Sobin et al. (2011)

Tabelle A2: TNM-Klassifikation kolorektaler Karzinome

T-Stadium	
Tx	Keine Informationen über lokale Tumordinfiltration verfügbar
Tis	Tumor durch Mucosa begrenzt; keine Infiltration der Lamina muscularis mucosae
T1	Infiltration durch Lamina muscularis mucosae in die Submucosa; keine Infiltration der Lamina muscularis propria
T2	Infiltration in, aber nicht über die Lamina muscularis propria hinaus
T3	Infiltration in Subserosa oder in nicht-peritoneales perikolisches oder perirektales Gewebe oder beides; keine Infiltration der Serosa oder Nachbarorgane
T4a	Infiltration der Serosa
T4b	Infiltration des Nachbargewebes oder Nachbarorgane
N-Stadium	
Nx	Keine Information über Lymphknotenbefall verfügbar
N0	Kein Lymphknotenbefall
N1a	Krebszellen in 1 Lymphknoten nachweisbar
N1b	Krebszellen in 2-3 regionalen Lymphknoten nachweisbar

N1c	Tumorsatelliten in Subserosa oder perikolischem oder perirektalem Fettgewebe; kein Befall regionaler Lymphknoten
N2a	Krebszellen in 4-6 regionalen Lymphknoten nachweisbar
N2b	Krebszellen in 7 oder mehr regionalen Lymphknoten nachweisbar
M-Stadium	
Mx	Keine Informationen über periphere Metastasen verfügbar
M0	Keine peripheren Metastasen nachweisbar
M1a	Metastasen in 1 peripherem Organ oder peripherem Lymphknoten
M1b	Metastasen in mehr als 1 peripherem Organ oder mehrere periphere Lymphknoten befallen oder peritoneale Metastasen nachweisbar

Klassifikation kolorektaler Karzinome gemäß nach TNM-Stadien; Tabelle modifiziert nach Brenner et al. (2014); ursprünglich zitiert aus Weisenberg E. (2017)

7 Literaturverzeichnis

- abcam (2019): LDH-Cytotoxicity Assay. Kit2 ab 65393. <https://www.abcam.com/ldh-assay-kit-cytotoxicity-ab65393.html>, abgerufen am: 06.06.2021
- Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JE (1994): A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to ³Hthymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170, 211–224
- André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F et al. (2009): Improved Overall Survival With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin As Adjuvant Treatment in Stage II or III Colon Cancer in the MOSAIC Trial. <https://ascopubs.org/doi/full/10.1200/JCO.2008.20.6771>, abgerufen am: 31.03.2019
- Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2017): Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66, 683–691
- Atsumi T, Chesney J, Metz C, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell R, Bucala R (2002): High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res* 62, 5881–5887
- Balin-Gauthier D, Delord J-P, Rochaix P, Mallard V, Thomas F, Hennebelle I, Bugat R, Canal P, Allal C (2006): In vivo and in vitro antitumor activity of oxaliplatin in combination with cetuximab in human colorectal tumor cell lines expressing different level of EGFR. *Cancer Chemother Pharmacol* 57, 709–718
- Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA et al. (2003): A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 348, 891–899
- Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D et al. (2012): The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603–607
- Beckert S, Farrahi F, Aslam RS, Scheuenstuhl H, Königsrainer A, Hussain MZ, Hunt TK (2006): Lactate stimulates endothelial cell migration. *Wound Repair Regen* 14, 321–324
- Bird A (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6–21
- Blenkinsopp WK, Stewart-Brown S, Blesovsky L, Kearney G, Fielding LP (1981): Histopathology reporting in large bowel cancer. *Journal of Clinical Pathology* 34, 509–513

- Bock K de, Georgiadou M, Carmeliet P (2013a): Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell Metab* 18, 634–647
- Bock K de, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Eelen G et al. (2013b): Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154, 651–663
- Bock K de, Mazzone M, Carmeliet P (2011): Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nat Rev Clin Oncol* 8, 393–404
- Boland CR, Goel A (2010): Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2073-2087.e3
- Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P (2008): Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 300, 2765–2778
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424
- Brenner H, Kloor M, Pox CP (2014): Colorectal cancer. *The Lancet* 383, 1490–1502
- Broström O, Löfberg R, Nordenvall B, Ost A, Hellers G (1987): The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. An epidemiologic study. *Scand J Gastroenterol* 22, 1193–1199
- Brouwer NP, Bos AC, Lemmens VE, Tanis PJ, Huguen N, Nagtegaal I d., Wilt JH de, Verhoeven RH (2018): An overview of 25 years of incidence, treatment and outcome of colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 143, 2758–2766
- Brown KM, Xue A, Mittal A, Samra JS, Smith R, Hugh TJ (2016): Patient-derived xenograft models of colorectal cancer in preclinical research: a systematic review. *Oncotarget* 2016, 66212–66225
- Cantelmo AR, Conradi L-C, Brajic A, Goveia J, Kalucka J, Pircher A, Chaturvedi P, Hol J, Thienpont B, Teuwen L-A et al. (2016): Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell* 30, 968–985
- Cantelmo AR, Pircher A, Kalucka J, Carmeliet P (2017): Vessel pruning or healing: endothelial metabolism as a novel target? *Expert Opin Ther Targets* 21, 239–247

- Carmeliet P, Jain RK (2011): Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 10, 417–427
- Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T (2011): Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS One* 6
- Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, Rodriguez C, Sinha R, Calle EE (2005): Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA* 293, 172–182
- Chen Y, CAO KE, WANG S, Chen J, He B, HE GU, CHEN Y, Peng B, ZHOU J (2016): MicroRNA-138 suppresses proliferation, invasion and glycolysis in malignant melanoma cells by targeting HIF-1 α . *Exp Ther Med* 11, 2513–2518
- Chesney J, Mitchell R, Benigni F, Bacher M, Spiegel L, Al-Abed Y, Han JH, Metz C, Bucala R (1999): An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: Role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 3047–3052
- Choi SW, Mason JB (2000): Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 130, 129–132
- Clem B, Telang S, Clem A, Yalcin A, Meier J, Simmons A, Rasku MA, Arumugam S, Dean WL, Eaton J et al. (2008): Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Mol Cancer Ther* 7, 110–120
- Clem BF, O'Neal J, Tapolsky G, Clem AL, Imbert-Fernandez Y, Kerr DA, Klarer AC, Redman R, Miller DM, Trent JO et al. (2013): Targeting 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) as a therapeutic strategy against cancer. *Mol Cancer Ther* 12, 1461–1470
- Conradi L-C, Brajic A, Cantelmo AR, Bouché A, Kalucka J, Pircher A, Brüning U, Teuwen L-A, Vinckier S, Ghesquière B et al. (2017): Tumor vessel disintegration by maximum tolerable PFKFB3 blockade. *Angiogenesis* 20, 599–613
- Conroy T, Lamfichekh N, Etienne P-L, Rio E, FRANCOIS E, Mesgouez-Nebout N, Vendrely V, Artignan X, Bouché O, Gargot D et al. (2020): Total neoadjuvant therapy with mFOLFIRINOX versus preoperative chemoradiation in patients with locally advanced rectal cancer: Final results of PRODIGE 23 phase III trial, a UNICANCER GI trial. *JCO* 38, 4007

- Cordero-Espinoza L, Hagen T (2013): Increased concentrations of fructose 2,6-bisphosphate contribute to the Warburg effect in phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient cells. *J Biol Chem* 288, 36020–36028
- Crawford J, Dale DC, Lyman GH (2004): Chemotherapy-induced neutropenia: risks, consequences, and new directions for its management. *Cancer* 100, 228–237
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C et al. (2004): Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351, 337–345
- Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J (1997): Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 57, 4749–4756
- DiMasi JA, Reichert JM, Feldman L, Malins A (2013): Clinical approval success rates for investigational cancer drugs. *Clin Pharmacol Ther* 94, 329–335
- Du J-Y, Wang L-F, Wang Q, Yu L-D (2015): miR-26b inhibits proliferation, migration, invasion and apoptosis induction via the downregulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 driven glycolysis in osteosarcoma cells. *Oncology Reports* 33, 1890–1898
- Dudley AC (2012): Tumor endothelial cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006536
- Fearon ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767
- Fibbe C (2018): Sequenzielle Therapie beim kolorektalen Karzinom – eine Orientierung für den Nicht-Onkologen.
<https://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/AVP/Artikel/201801/013h/index.php>, abgerufen am: 10.02.2020
- Finlay A Macrae MD (2019): Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors - UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors>, abgerufen am: 19.03.2019
- Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL (2012): Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 3, 153–173
- Fodde R (2002): The APC gene in colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 38, 867–871

- Fokas E, Allgäuer M, Polat B, Klautke G, Grabenbauer GG, Fietkau R, Kuhnt T, Staib L, Brunner T, Grosu A-L et al. (2019): Randomized Phase II Trial of Chemoradiotherapy Plus Induction or Consolidation Chemotherapy as Total Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced Rectal Cancer: CAO/ARO/AIO-12. *JCO* 37, 3212–3222
- Gao H, Korn JM, Ferretti S, Monahan JE, Wang Y, Singh M, Zhang C, Schnell C, Yang G, Zhang Y et al. (2015): High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nat Med* 21, 1318–1325
- Gatenby RA, Gillies RJ (2004): Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4, 891–899
- Ge X, Lyu P, Cao Z, Li J, Guo G, Xia W, Gu Y (2015): Overexpression of miR-206 suppresses glycolysis, proliferation and migration in breast cancer cells via PFKFB3 targeting. *Biochem Biophys Res Commun* 463, 1115–1121
- George TJ, Franke AJ, Chakravarthy AB, Das P, Dasari A, El-Rayes BF, Hong TS, Kinsella TJ, Landry JC, Lee JJ et al. (2019): National Cancer Institute (NCI) state of the science: Targeted radiosensitizers in colorectal cancer. *Cancer* 125, 2732–2746
- Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD (2001): Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. *J Immunol Methods* 252, 131–138
- Graham J, Mushin M, Kirkpatrick P (2004): Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov* 3, 11–12
- Gramont A de, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G et al. (2000): Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *JCO* 18, 2938–2947
- Group QC (2007): Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *The Lancet* 370, 2020–2029
- Gu M, Li L, Zhang Z, Chen J, Zhang W, Zhang J, Han L, Tang M, You B, Zhang Q et al. (2017): PFKFB3 promotes proliferation, migration and angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer* 8, 3887–3896
- Guittet L, Bouvier V, Mariotte N, Vallee JP, Arsène D, Boutreux S, Tichet J, Launoy G (2007): Comparison of a guaiac based and an immunochemical faecal occult blood test in screening for colorectal cancer in a general average risk population. *Gut* 56, 210–214

- Gustafsson NMS, Färnegårdh K, Bonagas N, Ninou AH, Groth P, Wiita E, Jönsson M, Hallberg K, Lehto J, Pennisi R et al. (2018): Targeting PFKFB3 radiosensitizes cancer cells and suppresses homologous recombination. *Nat Commun* 9, 3872
- Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, Roth A, Schmoll H-J, Tveit K-M, Gibson F (2015): A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 14, 1–10
- Häcker G (2000): The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301, 5–17
- Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C (2004): Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 25, 1543–1549
- Haibe Y, Kreidieh M, El Hajj H, Khalifeh I, Mukherji D, Temraz S, Shamseddine A (2020): Resistance Mechanisms to Anti-angiogenic Therapies in Cancer. *Front. Oncol.* 10, 221
- Half E, Bercovich D, Rozen P (2009): Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* 4, 22
- Haller DG (2000): Safety of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 14, 15–20
- Han J, Meng Q, Xi Q, Wang H, Wu G (2017): PFKFB3 was overexpressed in gastric cancer patients and promoted the proliferation and migration of gastric cancer cells. *Cancer biomarkers section A of Disease markers* 18, 249–256
- Han J, Meng Q, Xi Q, Zhang Y, Zhuang Q, Han Y, Jiang Y, Ding Q, Wu G (2016): Interleukin-6 stimulates aerobic glycolysis by regulating PFKFB3 at early stage of colorectal cancer. *International Journal of Oncology* 48, 215–224
- Han T, de Kang, Ji D, Wang X, Zhan W, Fu M, Xin H-B, Wang J-B (2013): How does cancer cell metabolism affect tumor migration and invasion? *Cell Adh Migr* 7, 395–403
- Holinski-Feder E, Morak M (2010): Familiäre adenomatöse Polyposis und andere Polyposis-syndrome. *Gastroenterologe* 5, 7–15
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E et al. (2004): Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350, 2335–2342

- Hypoxyprobe, Inc. (2017): Product Insert: Hypoxyprobe™ Kit: HPI Catalog # HP1-XXX. <http://site.hypoxyprobe.com/knowledge-center-articles/HP-1-Kit-Insert.pdf>, abgerufen am: 24.11.2020
- Ilyas M, Tomlinson IP (1996): Genetic pathways in colorectal cancer. *Histopathology* 28, 389–399
- Jain RK (2005): Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58–62
- Jain RK (2014): Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell* 26, 605–622
- Joanne M. Bowen, Rachel J. Gibson, Adrian G. Cummins, Dorothy M. K. Keefe (2006): Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Support Care Cancer* 14, 713–731
- Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, Pocard M, Goéré D, Mariani P, Landron S, Bigot L, Nemati F, Dartigues P et al. (2012): Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 18, 5314–5328
- Kahi CJ, Imperiale TF, Juliar BE, Rex DK (2009): Effect of screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7, 770-5
- Karahalios A, English DR, Simpson JA (2015): Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 181, 832–845
- Keefe DMK, Gibson RJ (2007): Mucosal injury from targeted anti-cancer therapy. *Support Care Cancer* 15, 483–490
- Kim S-G, Manes NP, El-Maghrabi MR, Lee Y-H (2006): Crystal structure of the hypoxia-inducible form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3): a possible new target for cancer therapy. *J Biol Chem* 281, 2939–2944
- Kinugasa T, Akagi Y (2016): Status of colitis-associated cancer in ulcerative colitis. *World J Gastrointest Oncol* 8, 351
- Klarer AC, O'Neal J, Imbert-Fernandez Y, Clem A, Ellis SR, Clark J, Clem B, Chesney J, Telang S (2014): Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) induces autophagy as a survival mechanism. *Cancer Metab* 2, 2

- Knudson AG (1985): Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45, 1437–1443
- Korzeniewski C, Callewaert DM (1983): An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 64, 313–320
- Krebs in Deutschland: Siehe Robert Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2017
- Krebs in Deutschland: Siehe Robert Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2019
- Kruschewski M, Pohlen U, Hotz HG, Ritz J-P, Kroesen AJ, Buhr HJ (2006): Ergebnisse der multiviszeralen Resektion des primären kolorektalen Karzinoms. *Zentralbl Chir* 131, 217–222
- Kuehn F, Mullins CS, Krohn M, Harnack C, Ramer R, Krämer OH, Klar E, Huehns M, Linnebacher M (2016): Establishment and characterization of HROC69 - a Crohn´s related colonic carcinoma cell line and its matched patient-derived xenograft. *Sci Rep* 6, 24671
- Kunkel M, Reichert TE, Benz P, Lehr H-A, Jeong J-H, Wieand S, Bartenstein P, Wagner W, Whiteside TL (2003): Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 97, 1015–1024
- Larsson SC, Orsini N, Wolk A (2005): Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 97, 1679–1687
- Leitlinie Kolorektales Karzinom (2019): Siehe Leitlinienprogramm Onkologie (AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe)
- Leitlinienprogramm Onkologie (AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe) (2019): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom (Langversion 2.1): AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL. <http://www.leitlinienprogrammmonkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/>, abgerufen am: 23.01.2022
- Leslie A, Stewart A, Baty DU, Mechan D, McGreavey L, Smith G, Wolf CR, Sales M, Pratt NR, Steele RJC et al. (2006): Chromosomal changes in colorectal adenomas: relationship to gene mutations and potential for clinical utility. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 126–135
- Li F-L, Liu J-P, Bao R-X, Yan G, Feng X, Xu Y-P, Sun Y-P, Yan W, Ling Z-Q, Xiong Y et al. (2018): Acetylation accumulates PFKFB3 in cytoplasm to promote glycolysis and protects cells from cisplatin-induced apoptosis. *Nat Commun* 9, 508

- Li H-M, Yang J-G, Liu Z-J, Wang W-M, Yu Z-L, Ren J-G, Chen G, Zhang W, Jia J (2017): Blockage of glycolysis by targeting PFKFB3 suppresses tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 36, 7
- Liang C-C, Park AY, Guan J-L (2007): In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2, 329 EP -
- Lin JS, Piper MA, Perdue LA, Rutter C, Webber EM, O'Connor E, Smith N, Whitlock EP: Screening for Colorectal Cancer: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force, Rockville (MD) 2016
- Linnekamp JF, van Hooff SR, Prasetyanti PR, Kandimalla R, Buikhuisen JY, Fessler E, Ramesh P, Lee, Kelly A. S. T., Bochove GGW, Jong JH de et al. (2018): Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in in vitro and in vivo models. *Cell Death Differ* 25, 616–633
- Liu J, Zhang C, Feng Z (2013): Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 46, 170–179
- Lu L, Chen Y, Zhu Y (2017): The molecular basis of targeting PFKFB3 as a therapeutic strategy against cancer. *Oncotarget* 2017, 62793–62802
- Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, Hunter T (2001): Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 21, 4016–4031
- Lynch H, La Chapelle A de (1999): Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 36, 801–818
- Lynch HT, La Chapelle A de (2003): Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348, 919–932
- Lynch HT, Smyrk T, Lynch J (1997): An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genetics and Cytogenetics* 93, 84–99
- Meyerhardt JA, Mayer RJ (2005): Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 352, 476–487
- Morales C, Ribas M, Aiza G, Peinado MA (2005): Genetic determinants of methotrexate responsiveness and resistance in colon cancer cells. *Oncogene* 24, 6842–6847

- Mouradov D, Sloggett C, Jorissen RN, Love CG, Li S, Burgess AW, Arango D, Strausberg RL, Buchanan D, Wormald S et al. (2014): Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Res* 74, 3238–3247
- Muto T, Bussey HJ, Morson BC (1975): The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36, 2251–2270
- Ninou AH, Lehto J, Chioureas D, Stigsdotter H, Schelzig K, Åkerlund E, Gudoityte G, Joneborg U, Carlson J, Jonkers J et al. (2021): PFKFB3 Inhibition Sensitizes DNA Crosslinking Chemotherapies by Suppressing Fanconi Anemia Repair. *Cancers (Basel)* 13, 3604
- Obach M, Navarro-Sabaté A, Caro J, Kong X, Duran J, Gómez M, Perales JC, Ventura F, Rosa JL, Bartrons R (2004): 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem* 279, 53562–53570
- Olin T (2019): PFKFB3 project | Kancera. <http://kancera.com/en/research/pfkfb3/>, abgerufen am: 19.04.2019
- Oliveira T de, Goldhardt T, Edelmann M, Rogge T, Rauch K, Kyuchukov ND, Menck K, Bleckman A, Kalucka J, Khan S et al. (2021): Effects of the Novel PFKFB3 Inhibitor KAN0438757 on Colorectal Cancer Cells and Its Systemic Toxicity Evaluation In Vivo. *Cancers (Basel)* 13
- O'Neal J, Clem A, Reynolds L, Dougherty S, Imbert-Fernandez Y, Telang S, Chesney J, Clem BF (2016): Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) suppresses glucose metabolism and the growth of HER2+ breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 160, 29–40
- Pal R, Wei N, Song N, Wu S, Kim RS, Wang Y, Gavin PG, Lucas PC, Srinivasan A, Allegra CJ et al. (2018): Molecular subtypes of colorectal cancer in pre-clinical models show differential response to targeted therapies: Treatment implications beyond KRAS mutations. *PLoS One* 13, e0200836
- Park IJ, Kim HC, Yu CS, Yoo JH, Kim JC (2005): Cutoff Values of Preoperative s-CEA Levels for Predicting Survivals after Curative Resection of Colorectal Cancer. *J Korean Med Sci* 20, 624–627
- Park J-H, Kim Y-H, Park EH, Lee S-J, Kim H, Kim A, Lee SB, Shim S, Jang H, Myung JK et al. (2019): Effects of metformin and phenformin on apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in chemoresistant rectal cancer. *Cancer Science* 110, 2834–2845

- Park JS, Burckhardt CJ, Lazcano R, Solis LM, Isogai T, Li L, Chen CS, Gao B, Minna JD, Bachoo R et al. (2020): Mechanical regulation of glycolysis via cytoskeleton architecture. *Nature* 578, 621–626
- Peng F, Li Q, Sun J-Y, Luo Y, Chen M, Bao Y (2018): PFKFB3 is involved in breast cancer proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *International Journal of Oncology* 52, 945–954
- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW (1992): APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235–237
- Promega (2016): CellTiter-Blue Cell Viability Assay Technical Bulletin: TB317 - celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol.pdf. <https://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol/>. <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol.pdf?la=de-de>, abgerufen am: 16.05.19
- PromoKine (2019): Fluorometric Cell Viability Kit 1: PK-CA707-30025-0 - PK-CA707-30025-2.pdf. <https://www.promocell.com/f/product-information/manual/PK-CA707-30025-2.pdf>, abgerufen am: 16.05.19
- Rockwell S, Dobrucki IT, Kim EY, Marrison ST, van Vu T (2009): Hypoxia and radiation therapy: past history, ongoing research, and future promise. *Curr Mol Med* 9, 442–458
- Rodriguez LG, Wu X, Guan J-L: Wound-Healing Assay; In: *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*; hrsg. v. Guan J-L. (SpringerLink Bücher 294): Humana Press Inc. Totowa, NJ 2005, 23–30
- Romeis B, Böck P, Denk H, Künzle H: *Romeis mikroskopische Technik*, 17., neubearb. Aufl; Urban und Schwarzenberg, München 1989
- Ros S, Schulze A (2013): Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer Metab* 1, 8
- Rothwell PM, Wilson M, Elwin C-E, Norrving B, Algra A, Warlow CP, Meade TW (2010): Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *The Lancet* 376, 1741–1750

- Sakakibara R, Kato M, Okamura N, Nakagawa T, Komada Y, Tominaga N, Shimojo M, Fukasawa M (1997): Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biochem* 122, 122–128
- Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF et al. (2004): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351, 1731–1740
- Schneider M, Huber J, Hadaschik B, Siegers GM, Fiebig H-H, Schüler J (2012): Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker. *BMC Cancer* 12, 96
- Schoors S, Bock K de, Cantelmo AR, Georgiadou M, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Kuchnio A, Wong BW, Quaegebeur A, Goveia J et al. (2014): Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. *Cell Metab* 19, 37–48
- Schulz-Heddergott R, Moll UM (2018): Gain-of-Function (GOF) Mutant p53 as Actionable Therapeutic Target. *Cancers*, 10(6), 188. *Cancers (Basel)* 10
- Schulz-Heddergott R, Stark N, Edmunds SJ, Li J, Conradi L-C, Bohnenberger H, Ceteci F, Greten FR, Dobbstein M, Moll UM (2018): Therapeutic Ablation of Gain-of-Function Mutant p53 in Colorectal Cancer Inhibits Stat3-Mediated Tumor Growth and Invasion. *Cancer Cell* 34, 298-314.e7
- Sherr CJ, Roberts JM (1995): Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149–1163
- Shinya H, Wolff WI (1979): Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. *Ann Surg* 190, 679–683
- Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S et al. (2012): Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62, 220–241
- Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF, Miller KD, Ma J, Rosenberg PS, Jemal A (2017): Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013. *J Natl Cancer Inst* 109
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C: *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th ed; Wiley, Somerset 2011

- Spitzner M, Emons G, Kramer F, Gaedcke J, Rave-Fränk M, Scharf J-G, Burfeind P, Becker H, Beissbarth T, Ghadimi BM et al. (2010): A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 78, 1184–1192
- Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau MWY, Lu KH, Roach N, Limburg PJ (2015): Hereditary Colorectal Cancer Syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the Familial Risk–Colorectal Cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *JCO* 33, 209–217
- Taylor DP, Stoddard GJ, Burt RW, Williams MS, Mitchell JA, Haug PJ, Cannon-Albright LA (2011): How well does family history predict who will get colorectal cancer? Implications for cancer screening and counseling. *Genet Med* 13, 385–391
- Telang S, Clem BF, Klarer AC, Clem AL, Trent JO, Bucala R, Chesney J (2012): Small molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase suppresses t cell activation. *J Transl Med* 10, 95
- Tian L, Goldstein A, Wang H, Lo HC, Kim IS, Welte T, Sheng K, Dobrolecki LE, Zhang X, Putluri N et al. (2017): Mutual Regulation of Tumour Vessel Normalization and Immunostimulatory Reprogramming. *Nature* 544, 250–254
- Türker Şener L, Albeniz G, Dinç B, Albeniz I (2017): iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Exp Ther Med* 14, 1866–1870
- van Schaftingen E, Jett MF, Hue L, Hers HG (1981): Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3483–3486
- van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W (2011): Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 728, 23–34
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525–532
- Weisenberg E. MD (2017): TNM staging of colorectal carcinoma (AJCC 8th edition). *PathologyOutlines.com* website.
<http://www.pathologyoutlines.com/topic/colontumorstaging8ed.html>, abgerufen am: 14.10.2020
- Weng M-L, Chen W-K, Chen X-Y, Lu H, Sun Z-R, Yu Q, Sun P-F, Xu Y-J, Zhu M-M, Jiang N et al. (2020): Fasting inhibits aerobic glycolysis and proliferation in colorectal cancer via the Fdft1-mediated AKT/mTOR/HIF1 α pathway suppression. *Nat Commun* 11, 1869

- Will JC, Galuska DA, Vinicor F, Calle EE (1998): Colorectal cancer: another complication of diabetes mellitus? *Am J Epidemiol* 147, 816–825
- Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, Flowers CR, Guerra CE, LaMonte SJ, Etzioni R, McKenna MT, Oeffinger KC, Shih Y-CT et al. (2018): Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin* 68, 250–281
- Wolin KY, Tuchman H (2011): Physical activity and gastrointestinal cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 186, 73–100
- Wolpin BM, Mayer RJ (2008): Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* 134, 1296–1310
- Wu JS (2007): Rectal Cancer Staging. *Clin Colon Rectal Surg* 20, 148–157
- Xu Y, An X, Guo X, Habtetsion TG, Wang Y, Xu X, Kandala S, Li Q, Li H, Zhang C et al. (2014): Endothelial PFKFB3 plays a critical role in angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34, 1231–1239
- Yalcin A, Clem BF, Imbert-Fernandez Y, Ozcan SC, Peker S, O'Neal J, Klarer AC, Clem AL, Telang S, Chesney J (2014): 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death Dis* 5, e1337-e1337
- Yalcin A, Clem BF, Simmons A, Lane A, Nelson K, Clem AL, Brock E, Siow D, Wattenberg B, Telang S et al. (2009): Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 284, 24223–24232
- Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J (2005): Cell migration in tumors. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 559–564
- Yan S, Zhou N, Zhang D, Zhang K, Zheng W, Bao Y, Yang W (2019): PFKFB3 Inhibition Attenuates Oxaliplatin-Induced Autophagy and Enhances Its Cytotoxicity in Colon Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 20, 5415
- Yang J, Wen J, Tian T, Lu Z, Wang Y, Wang Z, Wang X, Yang Y (2016): GLUT-1 overexpression as an unfavorable prognostic biomarker in patients with colorectal cancer. *Oncotarget* 8, 11788–11796

- Yi M, Ban Y, Tan Y, Xiong W, Li G, Xiang B (2019): 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 and 4: A pair of valves for fine-tuning of glucose metabolism in human cancer. *Mol Metab* 20, 1–13
- Zecchin A, Kalucka J, Dubois C, Carmeliet P (2017): How Endothelial Cells Adapt Their Metabolism to Form Vessels in Tumors. *Frontiers in Immunology* 8, 1750
- Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert-Koch-Institut (2018): Krebs - Darmkrebs.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html;jsessionid=078E8D80F73796CE0486D21F6AB70710.1_cid290, abgerufen am: 14.10.2020
- Zhang D, Luo G, Ding X, Lu C (2012): Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2, 549–561
- Zhou C-F, Li X-B, Sun H, Zhang B, Han Y-S, Jiang Y, Zhuang Q-L, Fang J, Wu G-H (2012): Pyruvate kinase type M2 is upregulated in colorectal cancer and promotes proliferation and migration of colon cancer cells. *IUBMB life* 64, 775–782
- Zhu W, Ye L, Zhang J, Yu P, Wang H, Ye Z, Tian J (2016): PFK15, a Small Molecule Inhibitor of PFKFB3, Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Inhibits Invasion in Gastric Cancer. *PLoS One* 11

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter PD Dr. Dr. Lena-Christin Conradi bedanken, die als Initiatorin und AG-Leitung den Anstoß für dieses Projekt gab und mich stets bei der Durchführung unterstützte. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Elisabeth Zeisberg, als Korrektorin und weitere Ansprechpartnerin für Denkanstöße und Begleitung des Projektes.

Ein Dank geht an Prof. Dr. Tim Reißbarth für die Durchführung der grafischen Darstellung und statistischen Auswertung der Daten des *xCELLigence*.

Ich möchte dem gesamten Laborteam für die großartige Zusammenarbeit, die vielen intensiven, produktiven und für mich persönlich wertvollen Arbeitsstunden bedanken. Benennen möchte ich dabei Jessica Eggert, die mir als Leiterin des Labors mit ihrem fachlichen Wissen und praktischen Erfahrungen immer als Ansprechpartnerin zur Verfügung stand. Ebenso hervorheben möchte ich Johanna Buschalsky, Chan-Rong Lai und Matthias Schulz, die mir als erfahrene technische Assistenten in der Zellkultur oft zur Seite standen. Ich bedanke mich bei Dr. Melanie Spitzner, die auf viele Fragen und Probleme eine Antwort und Lösung fand und mir vor allem bei den Tierexperimenten eine große Stütze war.

Ein großes Dankeschön geht an meinen direkten Laborpartner Marcus Edelmann für seine Zuverlässigkeit, Hilfsbereitschaft, Flexibilität, Engagement und vor allem seinen Ehrgeiz und Motivation, die er oft erfolgreich auf ich übertragen konnte, wenn mal wieder nicht alles so funktionierte wie geplant. Auch bei Chiara Jodszuweit, Gwendolyn Haas und Johannes Robert Fleischer bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag.

Ein großes Danke geht an die gute Seele des Labors, Birgit Jünemann, die nicht nur mit ihrer Expertise und Sorgfalt wertvolle Arbeit geleistet hat, sondern auch mit ihrer Fürsorge und Umsicht für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt hat.

Zuletzt möchte ich eine der wohl wichtigsten Personen im Zusammenhang mit dieser Arbeit benennen, meine Betreuer Dr. Tiago De Oliveira. Beginnend damit, dass er mich die Arbeit in der Zellkultur lehrte, über stetiges Supervidieren bis hin zum geduldigen Hand-in-Hand-Arbeiten, hatte er zudem immer ein offenes Ohr für jede Problematik und trug mit seiner positiven Einstellung und seinem unvergleichlichen Engagement dazu bei, dass wir gemeinsam neue Fortschritte machen konnten.