

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

**PFKFB3-Inhibition während einer
Radiochemotherapie des Rektumkarzinoms
– Überprüfung in einem *patient-derived*
*xenograft In-vivo-Modell***

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Marcus Edelmann

aus

Chemnitz

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

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

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. S. Rieken

Prüfungskommission

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

Ko-Referent: Prof. Dr. med. S. Rieken

Drittreferent: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 06.02.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "PFKFB3-Inhibition während einer Radiochemotherapie des Rektumkarzinoms – Überprüfung in einem *patient-derived xenograft In-vivo*-Modell" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 08.08.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis..... III

1	Einleitung	1
1.1	Das Kolorektale Karzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Risikofaktoren.....	1
1.1.3	Pathogenese.....	1
1.1.4	Klassifikation kolorektaler Karzinome	2
1.1.5	Stadienadaptierte Therapie des Rektumkarzinoms	4
1.2	Strahlenbiologie und Hypoxie-bedingte Strahlentherapieresistenz	5
1.3	Tumorangiogenese und antiangiogenetische Therapie	7
1.4	6-Phosphofructo-2-Kinase / Fructose-2,6-Biphosphatase 3.....	8
1.5	3PO – Inhibition von PFKFB3.....	9
1.6	Mögliche Auswirkungen einer PFKFB3-Blockade auf RT/RCT – Zielsetzung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material.....	12
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.2	Zellkulturreagenzien und Zelllinien.....	15
2.1.3	Reagenzien und Antikörper.....	16
2.1.4	Therapeutische Substanzen.....	17
2.1.5	Humane Tumorproben	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Allgemeine Zellkultur	18
2.2.2	Methoden zur Charakterisierung des Effekts von 3PO auf kolorektale Krebszelllinien HCT-116, HT-29, SW-1463 sowie HUVEC <i>in vitro</i>	20
2.2.3	Generierung von PDX-Modellen des KRK in PrkdcScid-Mäusen	26
2.2.4	Statistische Auswertung.....	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Einfluss des PFKFB3-Inhibitors 3PO auf HT-29, HCT-116, SW-1463 und HUVEC <i>in vitro</i>	34
3.1.1	Echtzeit-Zellanalyse von HCT-116, HT-29 und HUVEC unter Therapie mit 3PO....	34
3.1.2	Koloniebildungstest	36
3.1.3	Einfluss von 3PO auf die Zellproliferation von HCT-116, HT-29 und HUVEC nach 6 h und 24 h <i>in vitro</i>	37
3.1.4	Auswirkung der Kombinationstherapie von 3PO und Bestrahlung auf die Zellproliferation von HCT-116, HT-29 und HUVEC nach 24 h <i>in vitro</i>	38
3.1.5	Einfluss von 3PO auf den Zelltod von HCT-116, HT-29 und HUVEC <i>in vitro</i>	39
3.1.6	Auswirkung der Kombinationstherapie von 3PO und Bestrahlung auf den Zelltod von HCT-116, HT-29 und HUVEC <i>in vitro</i>	40
3.1.7	Einfluss von 3PO auf die Migration von HCT-116 und HT-29 <i>in vitro</i>	41

3.1.8	Auswirkung der Kombinationstherapie von 3PO und Bestrahlung auf die Migration von HCT-116 und HT-29 <i>in vitro</i>	42
3.1.9	Einfluss von 3PO auf die Invasivität von HCT-116 und HT-29 <i>in vitro</i>	44
3.1.10	Auswirkung der Kombinationstherapie von 3PO und Bestrahlung auf die Invasivität von HCT-116 und HT-29 <i>in vitro</i>	44
3.2	Etablierung von PDX-Modellen des KRK <i>in vivo</i>	46
3.3	Therapie humaner KRK mit einer Kombination aus 3PO und Bestrahlung.....	47
3.3.1	Untersuchung der Tumolvaskularisierung nach einer Kombinationstherapie mit 3PO und Bestrahlung.....	47
3.3.2	Analyse der Tumorphypoxie nach Behandlung mit 3PO und Bestrahlung.....	48
3.3.3	Wachstum der PDX-Modelle während einer Behandlung mit 3PO und Bestrahlung.....	49
3.3.4	Residuale Tumorfläche nach einer Behandlung mit 3PO und Bestrahlung.....	51
3.3.5	BrdU-Proliferationsindex nach einer Behandlung mit 3PO und Bestrahlung.....	52
3.4	Therapie humaner KRK mit einer Kombination aus 3PO und Radiochemotherapie.....	53
3.4.1	Untersuchung der Tumolvaskularisierung nach einer Kombinationstherapie aus 3PO und RCT.....	53
3.4.2	Analyse der Tumorphypoxie nach einer Behandlung mit 3PO und RCT.....	54
3.4.3	Wachstum der PDX-Modelle während einer Behandlung mit 3PO und RCT.....	55
3.4.4	Residuale Tumorfläche nach einer Behandlung mit 3PO und RCT.....	57
3.4.5	BrdU-Proliferationsindex nach einer Behandlung mit 3PO und RCT.....	58
4	Diskussion.....	60
4.1	3PO beeinflusst konzentrationsabhängig die Zellproliferation, Zellviabilität, Migrationsfähigkeit und Invasivität von kolorektalen Krebszellen.....	60
4.2	3PO wirkt strahlensensibilisierend in kolorektalen Krebszellen.....	62
4.3	Einschränkungen der <i>In-vitro</i> -Versuche.....	66
4.4	Etablierung von PDX-Mausmodellen des KRK und Einschränkungen der <i>In-vivo</i> -Versuche.....	66
4.5	3PO kombiniert mit RT/RCT nimmt Einfluss auf die Tumolvaskularisierung und induziert eine TVN.....	67
4.6	Die Kombinationstherapie aus 3PO und RT/RCT senkt die Tumorzellproliferation <i>in vivo</i>	69
4.7	Ausblick.....	72
5	Zusammenfassung.....	73
6	Literaturverzeichnis.....	75

Abkürzungsverzeichnis

3PO	<i>3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one</i>
5FU	5-Fluorouracil
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
CTB	<i>CellTiter-Blue</i>
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EZ	Endothelzelle
EZM	Extrazellulärmatrrix
F-2,6-BP	Fructose-2,6-Bisphosphat
F-6-P	Fructose-6-Phosphat
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
HAPs	Hypoxie-aktivierte Prodrugs
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNPCC	Hereditäre nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
HR	Homologe Rekombination
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
i. p.	<i>Intraperitoneal</i>
IVC	Individuell ventilierter Käfig
KRK	Kolorektales Karzinom
LDH	Laktatdehydrogenase
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDX	<i>Patient-derived xenograft</i>

PFK1	Phosphofruktokinase 1
PFKFB	6-Phosphofructo-2-Kinase / Fructose-2,6-Biphosphatase
RCT	Radiochemotherapie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Radiotherapie
RTCA	<i>Real Time Cell Analysis</i>
s. c.	<i>Subkutan</i>
t/c	<i>Treatment to control</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEZ	Tumorendothelzelle
TNT	Totale neoadjuvante Therapie
TVN	<i>Tumor vessel normalization</i>
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VE-Cadherin	Vaskulär-endotheliales-Cadherin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

1 Einleitung

1.1 Das Kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Mit 1,9 Millionen Neuerkrankungen und 935.000 Todesfällen jährlich zählt das kolorektale Karzinom (KRK) weltweit zur dritthäufigsten diagnostizierten Krebserkrankung und zur zweithäufigsten Krebstodesursache (Sung et al. 2021). Unterschiede in der Inzidenz finden sich vor allem in Abhängigkeit von der sozio-ökonomischen Entwicklung eines Landes. In wirtschaftlich entwickelten Regionen, die von einem westlichen Lebensstil geprägt sind, treten KRK im Vergleich zu weniger stark entwickelten Regionen häufiger auf (Arnold et al. 2017). Die Zahl der Neuerkrankungen lag 2013 in Deutschland bei 34.000 Männern und 28.500 Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei beiden Geschlechtern in der 6. und 7. Lebensdekade (Robert Koch-Institut 2016). Weltweit wird bis zum Jahr 2030 ein Anstieg der Erkrankungsfälle pro Jahr auf 2,2 Millionen erwartet (Arnold et al. 2017).

1.1.2 Risikofaktoren

Beeinflusst wird die Entstehung des KRK durch ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren und der genetischen Prädisposition eines Menschen. Zu den Risikofaktoren zählen der Konsum von Alkohol, Zigaretten und rotem Fleisch (Boffetta und Hashibe 2006; Liang et al. 2009; Chan et al. 2011). Weiterhin wird ein erhöhter Body-Mass-Index infolge von Übergewicht durch fettreiche Nahrung mit einem gesteigerten Erkrankungsrisiko assoziiert (Ma et al. 2013). Zudem sind Menschen, die an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden, prädisponiert ein KRK zu entwickeln (Ekbom et al. 1990). Dem gegenüber wurde gezeigt, dass körperliche Aktivität und eine ballaststoffreiche Ernährung negativ mit einem KRK assoziiert sind und daher präventiv wirksam zu sein scheinen (Thune und Lund 1996; Fuchs et al. 1999).

1.1.3 Pathogenese

Pathogenetisch werden sporadische von hereditären KRK abgegrenzt. Ausgehend von der normalen Darmmukosa entwickelt sich das sporadische KRK durch eine heterogene Ansammlung genetischer Mutationen und Veränderungen epigenetischer

Regulationsmechanismen. Histologische und molekulare Veränderungen im Kolon- und Rektumgewebe, die zur Karzinomentstehung führen, wurden durch die Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben (Vogelstein et al. 1988). Die Adenom-Karzinom-Sequenz verdeutlicht den mehrstufigen Prozess der Bildung von invasiven Adenokarzinomen aus benignen Adenomen. Je nach histologischem Wachstumsmuster werden tubuläre, villös-tubuläre und villöse Adenome unterschieden. Villöse Adenome besitzen das höchste Risiko in ein invasives Adenokarzinom zu entarten (Seidensticker und Schmiegel 1998). Der Übergang in ein invasives Karzinom benötigt mehrere Jahre bis Jahrzehnte. Die dabei stattfindenden genetischen Veränderungen sind gekennzeichnet durch eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z. B.: *APC* oder *TP53*) und einer Aktivierung von Onkogenen (z. B.: *KRAS*). Zudem sind in 80 % der Fälle strukturelle oder numerische Veränderungen des diploiden Chromosomensatzes, welche als Chromosomeninstabilität bezeichnet werden, nachweisbar (Fearon und Vogelstein 1990). Beim KRK werden hereditäre Formen gegenüber familiären Häufungen abgegrenzt. Hereditäre Formen können durch molekulargenetische Tests nachgewiesen werden. Bekannte Tumorsyndrome sind das hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC) und die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP). Beide Tumorsyndrome werden durch Keimbahnmutationen charakterisiert. Die häufigste erblich bedingte Darmkrebsform ist das HNPCC. Gekennzeichnet wird diese durch Mutationen in Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Mismatch Reparaturgenen (z. B.: *MSH2/6* oder *MLH1*). Aufgrund der fehlerhaften DNA-Reparatur kann im Tumorgewebe eine genetische Instabilität (Mikrosatelliteninstabilität) nachgewiesen werden (Al-Taie et al. 2001). Mutationen im *APC*-Gen sind charakteristisch für die FAP. Dies führt zur Bildung von mehreren Hundert kleinen adenomatösen Polypen im gesamten Kolon (Rustgi 2007).

1.1.4 Klassifikation kolorektaler Karzinome

Unter dem Krankheitsbild KRK werden maligne Neoplasien des Kolons und Rektums zusammengefasst. Gemessen durch ein starres Rektoskop werden diese anhand ihrer Höhenlokalisierung unterschieden. Beim Rektumkarzinom befindet sich der aborale Tumorrand 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt (Fielding et al. 1991). Abhängig von der Höhenlokalisierung des Rektumkarzinoms werden diese dem unteren, mittleren und oberen Rektumdrittel zugeordnet. Das Rektumkarzinom bildet 30 – 40 % aller KRK (Jemal et al. 2009). Das Staging von malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes erfolgt durch das TNM-Klassifikationssystem (Tbl. 1). Anhand der anatomischen Ausdehnung und des Verhaltens des Primärtumors (T), dem Befall der regionalen Lymphknoten (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) werden KRK klassifiziert.

Gemäß der TNM-Kriterien werden verschiedene Stadiengruppen (Tb1. 2) durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) zusammengefasst.

Tb1. 1 TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (Wittekind 2017)

T – Tumorausdehnung	
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ (CIS)
T1	Infiltration der Submukosa
T2	Infiltration der Muscularis propria
T3	Infiltration der Subserosa
T4a	Infiltration des viszeralen Peritoneums
T4b	Infiltration andere Organe / Strukturen
N – regionärer Lymphknotenbefall	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	1-3 regionäre Lymphknotenmetastasen
N1a	1 regionäre Lymphknotenmetastase
N1b	2-3 regionäre Lymphknotenmetastasen
N1c	Tumorknötchen im Fettgewebe der Subserosa
N2	≥ 4 regionäre Lymphknotenmetastasen
N2a	4-6 regionäre Lymphknotenmetastasen
N2b	≥ 7 regionäre Lymphknotenmetastasen
M – Fernmetastasierung	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ
M1c	Metastasen im Peritoneum

Tb1. 2 UICC-Stadiengruppierung des kolorektalen Karzinoms (Wittekind 2017)

Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium II A	T3	N0	M0
Stadium II B	T4a	N0	M0
Stadium II C	T4b	N0	M0
Stadium III A	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stadium III B	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Stadium III C	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stadium IV A	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium IV B	Jedes T	Jedes N	M1b
Stadium IV C	Jedes T	Jedes N	M1c

Tbl. 3 Grading des kolorektalen Karzinoms (Wittekind 2017)

G1	Gut differenziert	G3	Schlecht differenziert
G2	Mäßig differenziert	G4	Nicht differenziert

Das Grading berücksichtigt die histologische Differenzierung des Tumorgewebes und gibt Rückschlüsse auf die Malignität und Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors. Es werden vier Differenzierungsstufen bei Adenokarzinomen des Rektums unterschieden (Tbl. 3).

Low-grade Tumoren (G1 und G2) haben unabhängig vom TNM-Status eine günstigere Prognose als high-grade (G3 und G4) Tumoren (Edge 2010).

1.1.5 Stadienadaptierte Therapie des Rektumkarzinoms

Die Einteilung von Patient*innen in UICC Stadiengruppen bestimmt die Wahl der Behandlungsmodalitäten und die Planung der Therapieabfolge. Bei Patient*innen im Stadium I beträgt die 5-Jahres-Gesamtüberlebenszeit bis zu 95 %. Diese sinkt bei Patient*innen im Stadium IV auf unter 15 % (Bray et al. 2018).

1.1.5.1 Lokal begrenzte Rektumkarzinome (UICC-I-Stadien)

Bei low-risk Rektumkarzinomen (T1 und G1/2) ist die alleinige transanale endoskopische Mikrochirurgie mit Vollwandexzision als therapeutische Maßnahme ausreichend (Sgourakis et al. 2011). Die Standardprozedur bei high-risk Rektumkarzinomen (T1 und G3/4) bildet die transabdominelle Resektion mit totaler mesorektaler Exzision und damit Entfernung des regionären Lymphabflussgebietes (Heald und Karanja 1992). Eine präoperative Therapie wird für Patient*innen in UICC-I-Stadien nicht empfohlen (van Gijn et al. 2011).

1.1.5.2 Lokal fortgeschrittene Rektumkarzinome (UICC-II/-III-Stadien)

Die Primärtherapie bei Patient*innen im Stadium II/III richtet sich nach der Höhenlokalisierung des Tumors. Karzinome im oberen Rektumdrittel werden primär operativ versorgt (Georgiou et al. 2009). Liegen die Tumoren im mittleren oder unteren Rektumdrittel erfolgt unter definierten Umständen ebenfalls eine primäre Resektion. Dies ist der Fall, wenn T1- und T2-Tumoren in der Bildgebung eine mögliche Lymphknotenbeteiligung aufweisen bzw. T3-Tumoren im mittleren Rektumdrittel, mit geringer Infiltration in das perirektale Fettgewebe (< 1 – 5 mm), keinen Verdacht auf Lymphknotenmetastasen im MRT aufzeigen (Taylor et al. 2011). Werden diese genannten Kriterien nicht erfüllt, wird eine präoperative Radiochemotherapie (RCT) empfohlen. Dadurch wird die Resektabilität von großen Tumoren verbessert und die Anzahl Schließmuskel-erhaltender Operationen erhöht (Sauer et al. 2012). In Verbindung mit einer anschließenden tiefen anterioren Rektumresektion unter Mitnahme

des Mesorektums wird eine Senkung des Lokalrezidivrisikos nach 5 Jahren auf 6 % erreicht (Sauer et al. 2012). Die neoadjuvante RCT umfasst eine Kombinationsbehandlung aus konventionell-fraktionierter Radiotherapie (RT) mit der Gabe von Chemotherapieregimen bestehend aus den Fluoropyrimidinen 5-Fluorouracil (5FU) oder Capecitabin. Die RT setzt sich aus Einzeldosen von 1,8 – 2,0 Gy zusammen, welche bis zu einer Gesamtdosis von 45 – 50,4 Gy kumuliert werden. Der Abstand zur anschließenden operativen Versorgung sollte 6 bis 8 Wochen betragen (Brenner et al. 2014). Das Ansprechen von Patient*innen mit fortgeschrittenem Rektumkarzinom auf die neoadjuvante RCT ist interindividuell unterschiedlich. Subgruppen von Patient*innen können trotz anfänglicher Regression des Tumors eine Resistenz gegenüber der Therapie entwickeln (Ladanyimurray et al. 2001). Dabei korreliert das Ausmaß der Regression des Tumors mit dem langfristigen klinischen Ergebnis (Rödel et al. 2005; Fokas et al. 2017).

1.2 Strahlenbiologie und Hypoxie-bedingte Strahlentherapieresistenz

Gemeinsam mit der chirurgischen Behandlung und der Gabe von Chemotherapeutika zählt die Strahlentherapie zu den wichtigsten Modalitäten in der Therapie von malignen Tumorerkrankungen. Im Rahmen einer Krebserkrankung erhalten ca. 50 % aller Patient*innen eine Radiotherapie (Delaney et al. 2005). Schätzungen zufolge trägt die RT etwa zu 40 % zu einer kurativen Behandlung bei (Barnett et al. 2009). Die Wirkung der RT beruht auf dem Effekt ionisierender Strahlen, die vom Gewebe absorbiert werden und dabei zwei verschiedene Mechanismen auslösen. Zum einem wird die zelluläre DNA direkt geschädigt und zum anderen entstehen durch Wechselwirkungen mit intrazellulären Molekülen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in Form von Hydroxylradikalen (Baskar et al. 2012). Die Anzahl ROS ist sauerstoffabhängig. Beide Mechanismen, die direkte und indirekte Strahlenwirkung, führen zu einer Schädigung der zellulären DNA, zum Beispiel in Form von Doppelstrangbrüchen (DSB). In Abhängigkeit von Sauerstoffverfügbarkeit können entstandene DNA-Schäden repariert werden. Unter sauerstoffreichen Bedingungen werden DNA-Schäden fest fixiert. Wohingegen bei Sauerstoffmangel die Schäden repariert werden können (Bertout et al. 2008). Die durch Strahlung verursachten Zellschäden verhindern die Teilung und Proliferation von Zellen. Dies führt letztendlich zum Zelltod (Jackson und Bartek 2009). Abhängig von der Zellzyklusphase sind Zellen unterschiedlich stark empfindlich gegenüber Strahlung. Die stärkste Strahlenempfindlichkeit weisen Zellen während der Mitose- und G₂-Phase auf (Sinclair und Morton 1966; Sinclair 1968).

1.3 Tumorangiogenese und antiangiogenetische Therapie

Ab einer Größe von 1 bis 2 mm können Tumoren nicht mehr mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen aus dem umliegenden Gewebe per Diffusion versorgt werden. Sie benötigen eine eigene Gefäßversorgung (Folkman et al. 1963). Durch die verstärkte Produktion proangiogener Faktoren entkommen Tumorzellen der sauerstoff- und nährstoffarmen Situation. Der bekannteste Wachstumsfaktor, der die Tumorangiogenese fördert, ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF wird von Tumorzellen selbst sezerniert und fördert die Einsprossung neuer Tumorgefäße, die jedoch aufgrund der massiven Stimulation abnormale Charakteristika aufweisen (Ferrara 2002). Das Tumorblutgefäßsystem zeigt wesentliche Unterschiede gegenüber einem normalen Gefäßsystem auf (Carmeliet und Jain 2011). Das Tumorgefäßsystem ist sehr chaotisch und heterogen aufgebaut. Die einzelnen Gefäße verlaufen unregelmäßig durch das Tumorgewebe, sie variieren in ihrer Lumengröße und im Gefäßdurchmesser. Teilweise werden Gefäße vollständig durch den Tumor komprimiert, sodass Areale von der Blutversorgung abgetrennt werden (Nagy et al. 2010). Auch das Endothel von Tumorblutgefäßen weist charakteristische Unterschiede gegenüber dem Endothel normaler Gefäße auf. Die Endothelzellschicht von Tumoren erscheint inhomogen und permeabel. Tumorendothelzellen (TEZ) sind im Vergleich zu Endothelzellen (EZ) nur lose untereinander verbunden und weisen eine lückenhafte Anordnung in den Gefäßwänden auf. Weiterhin ist die Anzahl von gefäßstabilisierenden Perizyten in Tumorblutgefäßen erniedrigt (Carmeliet und Jain 2011). In Summe induziert die abnormale Gefäßstruktur von Tumoren ein hypoxisches Milieu.

Bisherige Ansätze in der antiangiogenen Therapie gehen zurück auf die Hypothese von J. Folkman. Diese besagt, dass die Blockierung der Angiogenese die Tumorprogression verlangsamt und somit das Überleben von Patient*innen verlängert (Folkman 1971). Heutzutage sind in der Behandlung von malignen Tumoren antiangiogene Medikamente zugelassen, die sich gegen VEGF oder seine Rezeptoren richten. Durch die Blockade von VEGF wird die Blutgefäßdichte in Tumoren reduziert, die Blutversorgung beeinträchtigt und das Tumorstadium verlangsamt. Jedoch beträgt der Überlebensvorteil von Patient*innen oft nur wenige Wochen bis Monate. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass die eingesetzten Wirkstoffe ein verstärktes hypoxisches Milieu im Tumor verursachen können (Jain 2014). Dies kann den Progress der Erkrankung fördern sowie die Ausbildung von Therapieresistenzen begünstigen. Alternative Strategien in der antiangiogenen Therapie beruhen auf der Induktion einer Tumorblutgefäßnormalisierung, engl. *tumor vessel normalization* (TVN), um eine regelhafte Durchblutung im Tumorgewebe wiederherzustellen. In Folge der Reorganisation des

Tumorgefäßsystem kann die Metastasierungsrate gesenkt und die Effektivität einer Chemotherapie gesteigert werden (Jain 2014). Eine Möglichkeit die Gefäßstruktur von Tumoren zu normalisieren, besteht über die Regulation der Endothelzellschicht und der Perizyten. Diese unterscheiden sich in ihrem Energiemetabolismus gegenüber EZ normaler Gefäße. TEZ sind durch eine stark erhöhte glykolytische Aktivität gekennzeichnet (Cantelmo et al. 2016). Als ein indirekter Stimulator der Glykolyse ist 6-Phosphofructo-2-Kinase / Fructose-2,6-Biphosphatase 3 (PFKFB3) bekannt (Yalcin et al. 2009b). PFKFB3 wird in TEZ vermehrt exprimiert und ist hemmbar (Cantelmo et al. 2016).

1.4 6-Phosphofructo-2-Kinase / Fructose-2,6-Biphosphatase 3

Die 6-Phosphofructo-2-Kinase / Fructose-2,6-Biphosphatase (PFKFB) ist ein bifunktionelles Enzym und katalysiert die Bildung und den Abbau von Fructose-2,6-Bisphosphat (F-2,6-BP) (van Schaftingen et al. 1987). PFKFB ist ein homodimeres Protein. Es besitzt eine C-Terminale Bisphosphatase Domäne und eine N-Terminale Kinase Domäne. Beide Domänen arbeiten unabhängig voneinander (Shi et al. 2017). Dadurch wird die intrazelluläre F-2,6-BP-Konzentration streng reguliert (Okar et al. 2001). Die PFKFB-Familie setzt sich aus vier Isoformen, PFKFB1 – 4 zusammen. PFKFB3 unterscheidet sich gegenüber anderen Isoformen durch eine stark erhöhte Kinaseaktivität (Sakakibara et al. 1997). Mit einem Kinase/Bisphosphatase Aktivitätsverhältnis von 740:1 wird die Bildung von F-2,6-BP verstärkt katalysiert. Dies führt zu einer intrazellulären Zunahme von F-2,6-BP (Rider et al. 2004). Als ein allosterischer Effektor wirkt F-2,6-BP aktivierend auf die Phosphofructokinase1 (PFK1), den potentesten Stimulator der Glykolyse. Durch die Aktivierung von PFK1 wird Fructose-6-phosphat (F-6-P) zu Fructose-1,6-bisphosphat phosphoryliert und die Glykolyse angetrieben (Abb. 2) (Van Schaftingen et al 1982). Angepasst an einen erhöhten Energiebedarf weisen Tumorzellen metabolische Veränderungen auf. Der Effekt, dass Krebszellen selbst in Anwesenheit von Sauerstoff eine verstärkte glykolytische Aktivität besitzen, wurde zum ersten Mal von Otto von Warburg beschrieben und als „Warburg-Effekt“ bekannt (Warburg 1956). Als ein Regulator der Glykolyse nimmt PFKFB3 eine wichtige Rolle im Metabolismus von Krebszellen ein. PFKFB3 wird in Tumorzellen überexprimiert und fördert das Wachstum, die Proliferation und die Migration von Krebszellen (Atsumi et al. 2002; Han et al. 2016). Weiterhin ist PFKFB3 für die Regulation der Angiogenese bekannt. Durch die von PFKFB3 gesteuerte Glykolyse wird die Proliferation und Migration von EZ reguliert (de Bock et al. 2013). Vor allem TEZ sind durch einen aktivierten glykolytischen Phänotyp und einer vermehrten Expression von PFKFB3 gekennzeichnet (Cantelmo et al. 2016). Eine

Strategie zur Normalisierung der Gefäßstruktur von Tumoren besteht darin, in den hochregulierten Glukose-Metabolismus von TEZ einzugreifen (Cantelmo et al. 2016). Eine Reduktion des glykolytischen Flusses in TEZ, ohne die Glykolyse direkt zu unterbrechen, ist durch die Hemmung von PFKFB3 möglich. Neben der großen Bedeutung von PFKFB3 für die Glykolyse steuert PFKFB3 auch die Homologe Rekombination (HR) während der S- und G₂-Phase des Zellzyklus. Dadurch können DNA-DSB in Folge von Bestrahlung repariert und Tumorzellen vor Strahlenschäden geschützt werden. Durch die Inhibierung der enzymatischen Aktivität von PFKFB3 und daraus resultierende Blockade der HR können Krebszellen gegenüber ionisierender Strahlung sensibilisiert werden (Gustafsson et al. 2018).

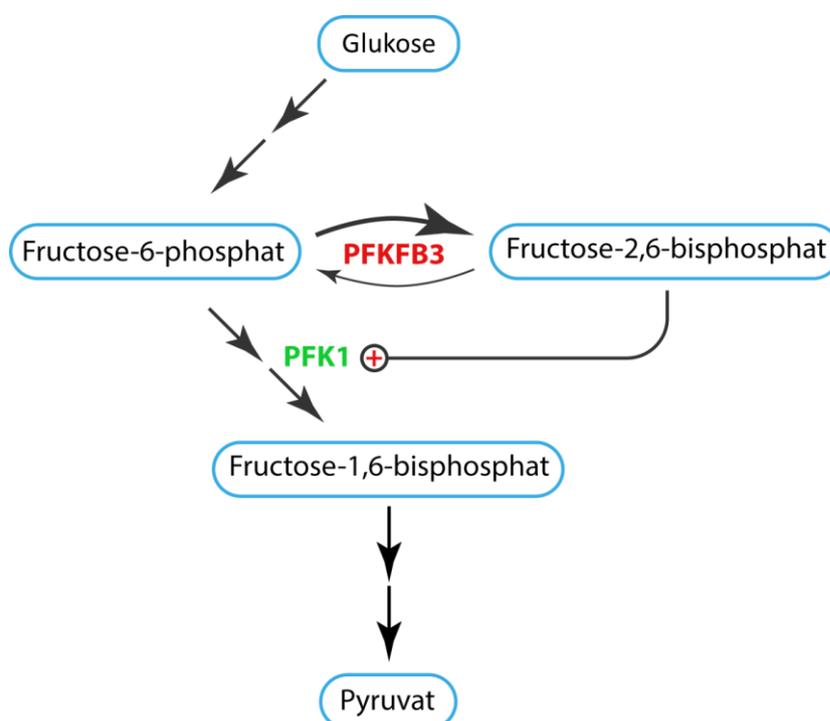


Abb. 2 Der Einfluss von PFKFB3 auf die Glykolyse. PFKFB3 katalysiert die Bildung von F-2,6-BP aus F-6-P. F-2,6-BP stimuliert PFK1 und wirkt somit aktivierend auf die Glykolyse.

1.5 3PO – Inhibition von PFKFB3

3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO) ist ein potenter Inhibitor von PFKFB3. Durch die selektive Hemmung der Aktivität von PFKFB3 wird die Glukoseaufnahme in Zellen vermindert, der glykolytische Fluss reduziert und die intrazelluläre Konzentration von F-2,6-BP gesenkt (Clem et al. 2008). Mit einer relativen Molekülmasse von 210 zählt 3PO zu den niedermolekularen Hemmstoffen. Als ein kompetitiver Inhibitor bindet 3PO intrazellulär die Substratbindungsstelle von PFKFB3. In Konkurrenz mit F-6-P wird auf diesem Weg die Bildung von F-2,6-BP unterdrückt. Eine Abnahme der Konzentration von F-2,6-BP wirkt bremsend auf die Aktivität von PFK1 und führt zu einer verminderten Stimulierung

der Glykolyse. Gleichzeitig wird die intrazelluläre Konzentration von Laktat, Adenosintriphosphat (ATP) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+/NADH) gesenkt (Clem et al. 2008). Als wichtige Substanzen für den Zellmetabolismus sind diese essenziell für Zellteilung und Proliferation. Durch verminderte Konzentrationen dieser Moleküle leitet sich der Arrest von Zellen in der G_2 -M-Phase durch 3PO ab (Clem et al. 2008). Krebszellen und TEZ stellen aufgrund des hochregulierten Glukose-Metabolismus und der vermehrten Expression von PFKFB3 ein interessantes Ziel für eine PFKFB3-Blockade durch 3PO dar. 3PO hat sich bereits in verschiedenen *In-vitro*-Experimenten als eine zytotoxische Substanz gegenüber Zellen des hepatozellulären Karzinoms, Jurkat-Zellen, Blasenkrebszellen und Melanomzellen erwiesen (Clem et al. 2008; Clem et al. 2013; Lea et al. 2015; Kotowski et al. 2020). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Glukose-Metabolismus von Erythrozyten, bei *In-vivo*-Gabe von 3PO, nicht beeinflusst wird. Dies muss beachtet werden, da Erythrozyten auf Glukose als Energieträger angewiesen sind (Telang et al. 2012). Conradi et al. beschrieben 2017 die Auswirkung einer dosisabhängigen PFKFB3-Blockade durch 3PO auf Tumorzellen und TEZ in einem Maus-Melanom-Modell *in vivo* (Conradi et al. 2017). Unter Verwendung einer maximal tolerablen Dosis (70 mg/kg 3PO; Reduktion der Glykolyserate um 40 %) wurde die Proliferation der Krebszellen gehemmt und das Tumorstadium gebremst. Das Tumorgefäßsystem wurde zerstört. Das Wachstum von TEZ wurde unterdrückt und daraus resultierend die Tumorthypoxie verstärkt. Das Gefäßsystem wurde undichter, wodurch Intravasation und Metastasierung von Krebszellen gefördert wurde (Conradi et al. 2017). Dem gegenüber wurde unter Einsatz einer geringen Dosierung (25 mg/kg 3PO; Reduktion der Glykolyserate um 15 – 20 %) eine TVN beobachtet, welche mit einer Abnahme von Maus-Melanom-Metastasen einherging. Die PFKFB3-Blockade mit einer geringen Dosis von 3PO führte zu einer Stärkung der vaskulären Barriere. TEZ zeigten eine glatte, regelmäßige und geordnete Anordnung. Zudem lagerten sich Perizyten in den Tumorgefäßwänden dichter aneinander. Diese Veränderungen führten aufgrund der verbesserten intratumoralen Zufuhr der Chemotherapeutika, zu einem größeren Therapieerfolg (Cantelmo et al. 2016; Conradi et al. 2017). Zusammenfassend wird mit einer PFKFB3-Blockade mittels einer niedrigen Dosierung von 3PO die Permeabilität des Tumorgefäßsystems verändert, die Stabilität der Tumorgefäße erhöht, die Tumorgefäßlumen vergrößert und die Oxygenierung des Tumorgewebes verbessert (Cantelmo et al. 2016). 3PO ist ein selektiver Hemmstoff von PFKFB3, wodurch andere Isoformen der PFKFB-Familie nicht beeinflusst werden. Dies macht 3PO zu einer attraktiven Substanz, um den hoch glykolytischen Metabolismus von Krebszellen sowie TEZ zu drosseln.

1.6 Mögliche Auswirkungen einer PFKFB3-Blockade auf RT/RCT – Zielsetzung

Eine Normalisierung von Tumorblutgefäßen kann eine alternative Therapiestrategie in der Behandlung von malignen Tumoren darstellen. Neben einer Verringerung der Metastasierung wird auch eine erhöhte Wirksamkeit von Chemotherapie erwartet (Carmeliet und Jain 2011). Durch die Wiederherstellung funktionsfähiger und dichter Gefäße als Teil eines homogenen und geordneten Tumorblutgefäßsystems kann die Perfusion im gesamten Tumorgewebe gesteigert werden. Dem hypoxischem Milieu entgegenwirkend führen geordnete und stabile Gefäße zu einer erhöhten Oxygenierung des Gewebes. Der Einsatz von 3PO könnte unterstützend zur RT wirken. Durch eine gesteigerte Bildung von ROS und der besseren Fixierung von DNA-Schäden könnten Hypoxie-bedingte Strahlentherapieresistenzen verringert werden.

Diese Arbeit überprüft, ob die PKFB3-Blockade mit 3PO zu einer TVN führt und dadurch die Oxygenierung von Tumorgewebe verbessert wird. Dabei soll die Effektivität einer RT bzw. RCT bei eventuell gesteigerter Tumoroxygenierung am Beispiel der Behandlung des Rektumkarzinoms evaluiert werden. Zunächst wird die konzentrationsabhängige Wirkung von 3PO auf Zelllinien des KRK anhand von *In-vitro*-Experimenten untersucht. Im Wesentlichen werden dabei die Auswirkungen auf Zellproliferation und Zelltod charakterisiert sowie Analysen zur Migration und Invasion durchgeführt. Anschließend wird der Nutzen von 3PO als Radiosensibilisator während einer RT anhand von Zelllinien des KRK *in vitro* evaluiert. Letztendlich erfolgt die Generierung von *patient-derived xenograft* (PDX) *In-vivo*-Mausmodellen des KRK in PrkdcScid-Mäusen mit anschließender Untersuchung des gefäßnormalisierenden Effekts von 3PO während einer RT bzw. RCT des Rektumkarzinoms.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tbl. 4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte	Firma	Herkunft
Anaesthetic Key Filler	UNO BV	Zevenaar, Niederlande
AutoClip System Applikator, 9 mm	Fine Science Tools	Heidelberg, Deutschland
AutoClip System Entferner	Fine Science Tools	Heidelberg, Deutschland
CONTRAfluran System	ZeoSys	Berlin, Deutschland
Bestrahlungsgerät, RS 225 X-Ray, Research System	Gulmay Medical Systems, Xstrahl Ltd.	Camberley, UK
Dampfgerar	Braun	Kronberg, Deutschland
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC Professional	Vacuu Brand	Wertheim, Deutschland
Haarschneider – Wella Contura HS61	Coty Beauty Germany	Darmstadt, Deutschland
Inkubator, Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific.	Waltham, USA
Inkubator C200, Inkubator CO2	Labotect	Göttingen, Deutschland
Kühlkombination Liebherr CP 3413	Liebherr-International	Biberach, Deutschland
Mehrkanalpipette Eppendorf Xplorer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axio Imager	Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Mikroskop, Leica DM IL	Leica	Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera, High-speed Leica EC3	Leica	Wetzlar, Deutschland
Pipetten, Eppendorf Research pro	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipetten, Eppendorf Research plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Geräte	Firma	Herkunft
Pipettierhelfer, Accu-Jet	Brand	Wertheim, Deutschland
Präzisionswaage, PL602-S	Mettler-Toledo	Columbus, USA
Präzisionswaage, ED224S	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Schlittenmikrotom Microtom HM 430	MICROM International	Walldorf, Deutschland
Sicherheitswerkbank, BDk-S	BDK Luft- und Reinraum- technik	Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Sterilbank, Biowizard Xline	Kojair	Vilppula, Finnland
Tiefkühlgerät, VIP Series MDF U74V	Sanyo Electric Biomedical	Tokio, Japan
Trockenschrank, Heraeus	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
UNO Gesichtsmaske für Mäuse	UNO BV	Zevenaar, Niederlande
UNO Induktionsbox und Abgaseinheit	UNO BV	Zevenaar, Niederlande
UNO Vaporisator Sigma Delta – Isofluran	UNO BV	Zevenaar, Niederlande
Victor X4 Multilabel-Plattenlesegerät	Perkin Elmer	Waltham, USA
Vortex-Genie 2 G-560 E	Scientific Industries	Bohemia, USA
Wärmeplatte Medax 12501	Medax	Neumünster, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert	Schwabach, Deutschland
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Deutschland
Wasserbad, Isotemp Model 2333	Fisher Scientific Laboratory	Marietta, USA
Wasseraufbereitungssystem, Milli-Q	Merck Millipore	Billerica, MA, USA
Zählkammer, Neubauer improved	Brand	Wertheim, Deutschland
Zentrifuge C-12000, Mini	National Labnet	Woodbridge, USA
Zentrifuge, Alegra X30R	Beckman Coulter	Brea, USA
Verbrauchsmaterial	Firma	Herkunft
Adhäsive Objektträger Starfrost	Engelbrecht Medizin und Labortechnik	Edermünde, Deutschland

Verbrauchsmaterial	Firma	Herkunft
Auslaufpipetten, serologisch	STARLAB	Hamburg, Deutschland
Boyden-Membran	Pieper Filter	Bad Zwischenahn, Deutschland
Deckgläser	Gerhard Menzel	Braunschweig, Deutschland
Einmalkanülen, Sterican, 26G	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen, Injekt-F 1 ml	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Insulinspritzen, BD Micro-Fine 0,5 ml	Becton Company	Franklin Lakes, USA
Kyroröhrchen 1,0 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Kyroröhrchen 2,0 ml	VWR International	Darmstadt, Deutschland
Mikrotomklingen Feather	Pfm	Köln, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas (150 und 230 mm)	Th. Geyer	Renningen, Deutschland
Petrischalen, 5cm, steril	Thermo Scientific	Waltham, USA
Pipettenspitzen, Kombitips plus 0,5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, Tip One (10, 100, 200, 300, 1000, 1250 µl)	STARLAB	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, RPT-Filter Tip One	STARLAB	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, Tip One, (10, 100, 200, 300, 1000, 1250 µl) steril	STARLAB	Hamburg, Deutschland
Platten, 96-Well	Corning	Croning, USA
Platten, 96-Well, schwarz	Corning	Croning, USA
Platten 12-Well Cyto One	STARLAB	Hamburg, Deutschland
Platten, 6-Well Cellstar	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäß (0,5 und 1,5 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (2 und 5 ml)	STARLAB	Hamburg, Deutschland
Röhrchen, (15 und 50 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

Verbrauchsmaterial	Firma	Herkunft
Skalpell, Feather Disposable Scalpell	Pfm	Köln, Deutschland
Spritzen, Original-Perfusor (50 ml)	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Zellkulturflaschen Cyto One (75 und 225 cm ²)	STARLAB	Hamburg Deutschland
Zellkultureinsätze, ibidi	ibidi	Martinsried, Deutschland
Zellkulturschale	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

2.1.2 Zellkulturreagenzien und Zelllinien

Tbl. 5 Zellkulturreagenzien und Zelllinien

Zellkulturreagenzien	Firma	Herkunft
0,25 % Trypsin -EDTA	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Anti-Anti	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Aqua	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Dulbecco´s Modified Eagle Medium	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Endopan 300SL Medium	Pan Biotech	Aidenbach, Deutschland
Fetal bovine serum (FBS)	Biochrom	Berlin, Deutschland
GlutaMAX	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Leibovitz´s – L15 Medium	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
McCoy´s 5A Medium	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Natriumchlorid 0,9 %	B. Braun	Melsungen, Deutschland
NutriFreeze D10 Kryokonservierung Medium	Biological Industries	Kibbutz Beit-Haemek, Israel
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH: 7,2	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

Zelllinie	Medium	Wachstumsbedingungen	Herkunft
HCT-116	McCoy's + 10 % FBS + 1 % Pen/Strep	37 °C Raumluft + 5 % CO ₂	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
HT-29	McCoy's + 10 % FBS + 1 % Pen/Strep	37 °C Raumluft + 5 % CO ₂	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
SW-1463	L-15 + 10 % FBS + 1 % Pen/Strep	37 °C Raumluft	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
HUVEC	Endopan 300SL	37 °C Raumluft + 5 % CO ₂	Dr. Argyris Papantonis (Institut für Pathologie, UMG Göttingen)

2.1.3 Reagenzien und Antikörper

Tbl. 6 Reagenzien und Antikörper

Reagenzien	Firma	Herkunft
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Citrat Puffer	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99 %	Chemie Vertrieb	Hannover, Deutschland
Eosin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Extrazellulärmatrix	Merck	Darmstadt, Deutschland
Formalin 37 %	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Hydrogenperoxid 30 %	Merck	Darmstadt, Deutschland
ProLong Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Target Retrieval Solution, pH 9	Agilent	Santa Clara, USA
Verdünnungsmedium	Ventana Medical Systems	Tuscon, USA
Vitro Clud-Eindeckmittel	R. Langenbrinck and Labor- und Medizintechnik	Emmendingen, Deutsch- land

Reagenzien	Firma	Herkunft	
Xylol	Merck	Darmstadt, Deutschland	
Primärantikörper	Verdünnung	Firma	Herkunft
BrdU (Rb)	1:500	Bio Rad	Hercules, USA
CD31(Rt)	1:500	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Pimonidazol FITC-MAB	1:100	Hydroxiprobe, Inc.	Burlington, USA
Sekundärantikörper	Verdünnung	Firma	Herkunft
Donkey anti-Rat H+L Biotin	1:200	Thermo Fisher	Waltham, USA
Envision HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit	konzentriert	Agilent	Santa Clara, USA
Rabbit anti-FITC HRP	1:100	Hydroxyprobe, Inc.	Burlington, USA

2.1.4 Therapeutische Substanzen

Tbl. 7 Therapeutische Substanzen

Substanz	Firma	Herkunft
Caprievie 50 mg/ml	Norbrook Laboratories Limited	Newry, Vereinigtes Königreich
Isofluran 1 ml/ml	CP-Pharma Handelsgesellschaft	Burgdorf, Deutschland
5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
3PO	ChemBridge Corporation	San Diego, USA

2.1.5 Humane Tumorproben

Tbl. 8 Humane Tumorproben

Tumorprobe	Herkunft
Rektumkarzinom – HROC239	Universitätsmedizin Rostock, Abteilung für Molekulare Onkologie und Immuntherapie
Kolorektales Karzinom – Gö Pt. 23	Universitätsmedizin Göttingen, Klinik für Allgemein-Viszeral- und Kinderchirurgie

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkultur

Die Arbeit in der Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank. Durch das Einleiten gefilterter Luft wurden verwendete Materialien und Substanzen vor Kontamination geschützt.

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Durch die Erwärmung in einem 37 °C warmen Wasserbad wurden die Zelllinien aufgetaut. Sobald die Zellsuspension den Aggregatzustand von fest in flüssig wechselte, wurde die Lösung in ein 15 ml Falcon übertragen. Durch Zugabe von 10 ml frischen Zellkulturmedium und anschließender Zentrifugation bei 500 G und 4 °C wurden Rückstände des Einfriermediums entfernt. Das gewonnene Zellpellet wurde in neuen Zellkulturmedium homogenisiert und in eine neue Zellkulturflasche plattiert.

2.2.1.2 Mediumwechsel

Zellen in Kultur benötigen zur Differenzierung und Proliferation Nährstoffe. Diese liefert das Nährmedium. Um den Zellen optimale Bedingungen zu liefern, wurde das Nährmedium in einem festen Intervall aller drei Tage gewechselt. Dazu wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und danach vorgewärmtes Kulturmedium zur Zellkultur hinzugefügt. Bei einer 75 mm² Zellkulturflasche wurden 12 ml altes Medium entfernt und anschließend 12 ml frisches Medium hinzugefügt.

2.2.1.3 Passagierung von Zellen

Sobald der Boden der 75 mm² Zellkulturflasche zu 80 – 90 % konfluent mit Zellen bedeckt war, erfolgte die Passagierung der Zellkultur. Nach dem Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen mit 10 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gewaschen. Dadurch wurden tote Zellen entfernt und eventuelle Reste des Kulturmediums verdünnt, wodurch die Aktivität von Trypsin beeinflussbar wäre. Nach der Zugabe von 3 ml Trypsin und anschließender 10-minütiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ lösten sich die Zellen aus dem stabilen Monolayer. Um die weitere enzymatische Aktivität von Trypsin zu stoppen, wurden 12 ml des Kulturmediums mit 10 % FBS dazugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 1 ml neuem Kulturmedium resuspendiert. Im Verhältnis 1:2 bis 1:12, abhängig von der Pelletgröße, wurden die Zellen verdünnt und in ein neues Kulturgefäß ausplattiert.

2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung einer Zellkultur wurden die Zellen trypsinisiert und bei 500 G für fünf Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 700 µl Cell-Freezing-Medium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Zellen wurden kontinuierlich mit -1 °C pro Minute in einer Einfrierbox bis auf -80 °C abgekühlt.

2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der exakten Zellzahl für Experimente wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dafür wurden die Zellen trypsinisiert, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 1 ml neues Medium hinzugefügt. Anschließend wurden 10 µl Trypanblau mit 10 µl homogenisierter Zellsuspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Bei Raumtemperatur wurde dies für zwei Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden 10 µl des Ansatzes in eine Neubauer-Zählkammer pipetiert. Unter einem Lichtmikroskop wurden die farblosen, vitalen Zellen in vier Quadranten gezählt. Anhand der Formel

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl gezählter Quadranten}} \times 10.000 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

wurde die Anzahl der Zellen in Suspension bestimmt.

2.2.1.6 Zelllinien

Verwendete Zelllinien wurden mit 12 ml Medium in einer 75 mm² Zellkulturflasche bei 37 °C ohne CO₂ (SW-1463) bzw. 5 % CO₂ (HCT-116 und HT-29) in einem Inkubator kultiviert. Neben den kolorektalen Tumorzelllinien HCT-116 und HT-29 sowie der Rektumzelllinie SW-1463 wurden aus Nabelschnurvenen isolierte Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) verwendet. Für die Experimente wurden Zellen zwischen den Passagen 5 – 12 (HCT-116, HT-29 und SW-1463) und den Passagen 3 – 7 (HUVEC) eingesetzt.

2.2.1.7 Sterilisation von Material

Um Material steril zu halten und vor Mikroorganismen zu schützen, wurde dies bei 121 °C feuchter Hitze und 10⁵ Pascal für mindestens 20 Minuten autoklaviert. Die Heißluftsterilisation von Präparationsbesteck erfolgte bei 180 °C für 3 h.

2.2.1.8 Filtration von Flüssigkeiten

Die Filtration von Lösungen wurde durch einen 0,22 µm großen Sterilfilter durchgeführt.

2.2.2 Methoden zur Charakterisierung des Effekts von 3PO auf kolorektale Krebszelllinien HCT-116, HT-29, SW-1463 sowie HUVEC *in vitro*

2.2.2.1 xCELLigence

2.2.2.1.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Durch Messung der Impedanz stellt die xCELLigence-Software eine Methode dar, um Zell-Proliferation, -Adhäsion, -Morphologie und -Tod in Echtzeit zu messen und zu analysieren (Xing et al. 2005). Am Boden der 16 Well Platten befinden sich Mikrogoldelektroden. Durch diese fließt ein elektrischer Strom während der Messung. In definierten Zeitintervallen misst die xCELLigence-Software die Veränderungen des Wechselstromwiderstands zwischen den mit Gold beschichteten Elektroden. Dabei wird die Impedanz der Elektroden durch die biologischen Eigenschaften der Zellen beeinflusst. Veränderungen der Zellgröße, Zellanzahl und Zelladhäsion führen zu Veränderungen der Impedanz. Der Zellstatus wird als Zellindex angegeben. Um Auswirkungen verschiedener Konzentrationen von 3PO auf Veränderungen des Zellstatus zu untersuchen, wurde der xCELLigence-Assay verwendet.

2.2.2.1.2 Bestandteile des Systems

Bestandteil des xCELLigence-Systems ist die *Real Time Cell Analysis* (RTCA) Plattenstation, die sich in einem Inkubator befindet. Diese Analyseeinheit ist mit einem Computer außerhalb des Inkubators, mit installierter xCELLigence-RTCA-Software, verbunden. Auf die Plattenstation werden die 16 Well Platten eingesetzt. Über die mit Gold beschichteten Sensorelektroden am Boden des Wells erfolgt die Messung der Impedanz.

2.2.2.1.3 Durchführung

Auf die goldbeschichtete 16 Well Platten wurden 100 µl vorgewärmtes Medium pro Well pipettiert. Anschließend wurden 100 µl Zellsuspension mit 10.000 Zellen in jedes Well platziert. Um während des Versuchs eine feuchte Kammer zu gewährleisten, wurde in die Wellzwischenräume PBS hinzugefügt. Jedes Well wurde vorsichtig pipettiert und das gesamte Volumen von 200 µl wurde nicht überschritten. Anschließend wurden die Platten in der RTCA Plattenstation angebracht und eingelesen. In der xCELLigence-Software wurden eventuelle Fehler behoben und die verschiedenen Konditionen festgelegt. Nach einer zwei-stündigen Äquilibrierungsphase im Inkubator folgte die Zugabe von 10 µl des PFKFB3-Inhibitors 3PO. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen von 3PO (10 µM, 25 µM und 50 µM) verwendet. Nach erneutem Einlesen in die RTCA Station wurde die Messung gestartet. Diese erfolgte über einen Zeitraum von 96 h und beinhaltete 1153 Messungen in einer Frequenz von fünf Minuten. Während des Messvorgangs wurde die Platte bei 37 °C und 5 %

CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden erfolgte die erneute Zugabe des Inhibitors. Nach 96 h stoppte die Messung automatisch. Die Daten wurden durch die xCELLigence-Software analysiert. Zur graphischen Darstellung wurde der Zellindex im zeitlichen Verlauf angegeben.

2.2.2.2 Koloniebildungstest

2.2.2.2.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Um das Klonierungsverhalten von kolorektalen Krebszellen HCT-116, HT-29 und SW-1463 unter dem Einfluss von 3PO in Kombination mit Bestrahlung zu untersuchen, wurde ein Koloniebildungstest durchgeführt. Aus einer einzelnen Zelle entstehen durch mitotische Teilung Zellklone, die sich in Kolonien zusammenlagern. Durch die Behandlung mit ionisierender Strahlung nimmt die Teilungsfähigkeit von Zellen ab, sodass die geschädigten Zellen nicht mehr in der Lage sind, Kolonien zu bilden.

2.2.2.2.2 Durchführung

Für den Koloniebildungstest wurden HCT-116, HT-29 und SW-1463 Zellen in entsprechender Zellzahl (Tbl. 9) auf 6 Well Platten in 2 ml Nährmedium ausgesät und inkubiert.

Tbl. 9 Verwendete Zellzahlen und Wachstumsdauer des Koloniebildungstestes

Dosis	HCT-116	HT-29	SW-1463
0 Gy	500	200	750
1 Gy	500	200	750
2 Gy	500	200	750
4 Gy	1000	400	1500
6 Gy	1500	600	2250
8 Gy	2000	800	3000
Wachstumsdauer	6 Tage	7 Tage	14 Tage

Die Bestrahlung erfolgte 24 h nach dem Aussetzen der Zellen mit einer Dosis von 0 Gy (nicht bestrahlte Kontrolle), 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung waren alle Zellen am Boden der Wells adhärirt, ohne eine mitotische Zellteilung durchlaufen zu haben. Die Zugabe von 2,5 µM 3PO erfolgte 4 h vor der Bestrahlung. Im Anschluss wurden die Zellen für 6 Tage (HCT-116) bzw. 7 Tage (HT-29) bzw. 14 Tage (SW-1463) inkubiert. Danach wurde das Nährmedium entfernt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mittels 70 % Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Kristallviolett für 20 Minuten gefärbt. Die Bestimmung der Anzahl der gebildeten

Kolonien erfolgte unter einem Stereomikroskop. Als Kolonie wurden Zellhaufen bestehend aus mehr als 50 Zellen gezählt.

2.2.2.3 CellTiter-Blue-Assay

2.2.2.3.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Um die Auswirkung des PFKFB3-Inhibitors 3PO auf die Proliferation von Tumorzelllinien und HUVEC zu untersuchen, wurde ein *CellTiter-Blue*(CTB)-Assay durchgeführt (Gloeckner et al. 2001). Der CTB-Assay stellt eine geeignete Methode dar, um mit Hilfe von Fluoreszenz, die zelluläre Lebensfähigkeit an einem bestimmten Zeitpunkt zu bestimmen. Durch die Zugabe von blauem, nicht fluoreszierendem Resazurin und anschließender Reduktion des Stoffes durch viable Zellen in pinkes, fluoreszierendes Resofurin, lässt sich mit Hilfe eines Fluoreszenz-Readers die Zellviabilität bestimmen. Je stärker eine Zelle geschädigt ist, desto weniger kann diese Resazurin verstoffwechseln. Wohingegen viable Zellen die Fähigkeit besitzen, Resazurin in Resofurin zu reduzieren. Daraus resultiert eine Zunahme der gemessenen Fluoreszenz mit einer steigenden Anzahl viabler und proliferierender Zellen. Dieser Test gilt als Nachweis für die Messung von Zytotoxizität in der Zellkultur (Gonzalez und Tarloff 2001).

2.2.2.3.2 Durchführung

Zur Bestimmung der Proliferation der Zelllinien *in vitro* wurden 96 Well Platten mit Triplikaten zu je 10.000 Zellen HCT-116 und HT-29 sowie 15.000 Zellen für HUVEC in 100 μ l Nährmedium vorbereitet. Nach einer Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht erfolgte die Zugabe von 3PO in unterschiedlichen Konzentrationen (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M). Anschließend wurden die Zellen für 6 h und 24 h inkubiert. Um eine unterstützende Wirkung von 3PO auf ionisierende Strahlung zu untersuchen, wurden die Zellen in einem parallelen Versuch 4 h nach der Zugabe von 3PO bestrahlt. Die Radiatio mit einer Dosis von 1 Gy/min wurde durchgeführt mit dem RS 225 X-Ray Bestrahlungssystem bei 200 kV, 15 mA und einem 0,5 mm Kupfer-Filter. Die Bestrahlungszeit betrug sechs Minuten. Dies entsprach einer Gesamtdosis von 6 Gy. Eine Stunde vor Behandlungsende wurden 10 μ l Resazurin in jedes Well hinzugefügt, die Platten leicht geschwenkt und bis zum Endpunkt der Behandlung inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz wurde durch ein Multilabel-Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 590 nm durchgeführt. Anschließend wurden die Fluoreszenzmittelwerte der Triplikate gebildet. Der Test wurde dreimal durchgeführt. Alle Daten wurden durch GraphPad Prism 8 statistisch ausgewertet und visualisiert.

2.2.2.4 LDH-Assay

2.2.2.4.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, welches in Zellen des menschlichen Organismus vorkommt. Das Enzym wird beim Zerfall von Zellen freigesetzt und ist somit im Kulturmedium nachweisbar. Eine erhöhte Freisetzung von LDH weist auf einen erhöhten Zelluntergang hin. Um die zytotoxische Wirkung des PFKFB3-Inhibitors 3PO zu bestimmen, wurde ein LDH-Assay durchgeführt. Dabei wird das ins Cytoplasma freigesetzte LDH, durch eine enzymatische Reaktion, die zu einem Farbumschlag von Tetrazoliumchlorid in rotes Formazan führte, nachgewiesen. Mit Hilfe eines Multilabel-Plattenlesegeräts wird bei einer Wellenlänge von 490 nm, welches dem Absorptionsmaximum von Formazan entspricht, die Absorptionsrate bestimmt. Diese verhält sich proportional zur LDH-Freisetzung und lässt somit Rückschlüsse auf die Stärke des Zelluntergangs zu.

2.2.2.4.2 Durchführung

Auf eine 96-Well Platte wurden 7.500 Zellen HT-29, HCT-116 und HUVEC in 100 µl Nährmedium pipettiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das alte Medium vorsichtig entfernt und 100 µl frisches Medium hinzugefügt. Dies beinhaltete die verschiedenen Konzentrationen des PFKFB3-Inhibitors 3PO (10 µM, 25 µM, 50 µM und 100 µM). Anschließend wurden die Zellen für 48 h inkubiert. Parallel wurde der zytotoxische Effekt von 3PO in Kombination mit einer Radiotherapie untersucht. Dazu wurden die Zelllinien 4 h nach Zugabe von 3PO bestrahlt. Die Radiatio mit einer Dosis von 1 Gy/min wurde durchgeführt mit dem RS 225 X-Ray Bestrahlungssystem bei 200 kV, 15 mA und einem 0,5 mm Kupfer-Filter. Die Bestrahlungszeit betrug sechs Minuten. Dies entsprach einer Gesamtdosis von 6 Gy. Vor Therapieende wurden 100 µl frisch hergestellter Reaktionsmischung in jedes Well hinzugefügt. In Alufolie eingepackt und somit vor Licht geschützt, wurden die Platten bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Vor der Messung der Absorption wurden 50 µl Stopp Lösung in jedes Well pipettiert. Die Messung der Absorption erfolgte in einem Multilabel-Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 490 nm. Der Test wurde dreimal durchgeführt. Alle Daten wurden durch GraphPad Prism 8 statistisch ausgewertet und visualisiert.

2.2.2.5 Wundheilungs-Assay

2.2.2.5.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Um den Einfluss des PFKFB3-Inhibitors 3PO auf das Migrationsverhalten von HCT-116 und HT-29 Zellen zu untersuchen, wurde ein Wundheilungs-Assay durchgeführt. Anhand der Geschwindigkeit, des Verschlusses einer definierten Spaltbreite, kann eine Aussage über das Migrationsverhalten der Zelllinien getroffen werden.

2.2.2.5.2 Durchführung

Zur Herstellung einer definierten Spaltbreite von 500 μm wurden die Zellkultureinsätze auf einer 12 Well Platte platziert. Durch die Zugabe von 70 μl Zellsuspension wurden 30.000 HT-29 bzw. HCT-116 Zellen in das Transwellinsert ausgesät. Die Inkubation bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 erfolgte so lange, bis die Böden der Kammern von einem konfluenten Monolayer bedeckt waren. Anschließend wurden die Zellkultureinsätze vorsichtig mit einer sterilen Pinzette entfernt. Das alte Medium wurde abgesaugt. Die Zellen wurden gründlich mit PBS gewaschen und 1 ml Nährmedium, wurde unter Zusatz von 3PO in unterschiedlichen Konzentrationen (10 μM und 25 μM) hinzugefügt. Um einen möglichen Effekt von 3PO in Kombination mit ionisierender Strahlung zu untersuchen, wurden die Platten in einem parallelen Versuch 4 h nach der Zugabe von 3PO bestrahlt. Die Radiatio mit einer Dosis von 1 Gy/min wurde mit dem RS 225 X-Ray Bestrahlungssystem bei 200 kV, 15 mA und einem 0,5 mm Kupferfilter durchgeführt. Die Bestrahlungszeit betrug sechs Minuten. Dies entsprach einer Gesamtdosis von 6 Gy. Die Darstellung des Verschlusses des zellfreien Kratzers wurde an verschiedenen Zeitpunkten mit einer Mikroskop Kamera festgehalten. Die Auswertung mit ImageJ erfolgte durch die Bestimmung der Flächengröße an verschiedenen Zeitpunkten. Um den Inhalt der zellfreien Fläche zu bestimmen wurde ein Rahmen entlang der Zellgrenze gezogen und mit ImageJ analysiert (Abb. 3).

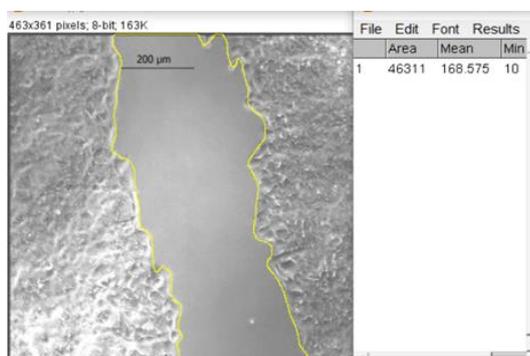


Abb. 3 Analyse der Migrationsfähigkeit von HCT-116 und HT-29 Zellen. Zur Messung der zellfreien Fläche zwischen den gegenüberliegenden Zellfronten wird ein gelber Rahmen entlang der Zellgrenzen gezogen und anschließend mit ImageJ analysiert.

Veränderungen der Fläche des Spalts (A_x) wurden in Relation zur Fläche des Spalts zum Zeitpunkt 0 h (A_0) gesetzt. Der daraus resultierende prozentuale Anteil beschreibt die Migrationsfähigkeit der Zellen. Anhand der folgenden Formel wurde die Migration berechnet:

$$\text{Migration (\%)} = \frac{A_0}{A_x}$$

A_0 : Fläche des Spalts zum Zeitpunkt 0

A_x : Fläche des Spalts zum Zeitpunkt x

2.2.2.6 Boyden-Kammer-Assay

2.2.2.6.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Der Boyden-Kammer-Assay stellt eine geeignete Methode dar, um das Invasionsverhalten von HCT-116 und HT-29 Zellen unter Einfluss des PFKFB3-Inhibitors 3PO zu untersuchen. Dabei wird die Invasivität der Tumorzellen mit Hilfe einer Boyden-Kammer (Abb. 4) überprüft. Aufgebaut ist die Boyden-Kammer aus zwei Kammerhälften. Diese sind durch eine Membran mit einer Porengröße von $10 \mu\text{m}$ voneinander getrennt. Um die Invasivität zu beurteilen, werden HCT-116 und HT-29 Zellen in die obere Kammer ausgesetzt und für 96 h inkubiert. Durch die Bestimmung der Anzahl an Zellen, die nach der Inkubationszeit in die untere Kammer gelangt sind, kann eine Aussage über das Invasionsverhalten getroffen werden.

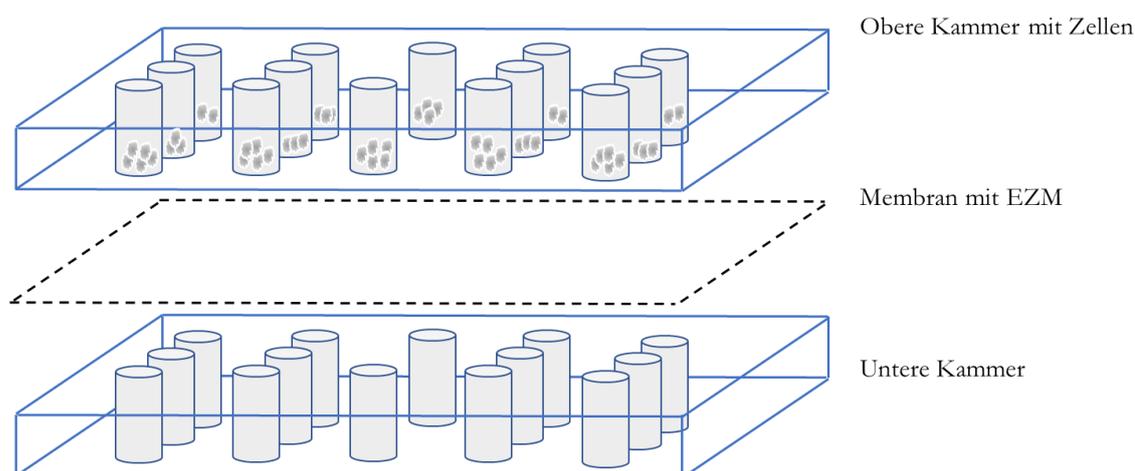


Abb. 4 Schematischer Aufbau einer Boyden-Kammer. Nachdem die untere Kammer mit Medium befüllt wurde, wird eine Membran (schwarz gestrichelt), beschichtet mit Extrazellulärmatrix (EZM), aufgelegt. Anschließend werden die untere und obere Kammerhälfte fest verschraubt. In die obere Kammer erfolgt die Zugabe der Zellen.

2.2.2.6.2 Durchführung

Die Boyden-Kammer wurde in der wissenschaftlichen Werkstatt der Universitätsmedizin Göttingen hergestellt. Für jeden Versuch wurde eine sterile Boyden-Kammer verwendet. Zunächst wurde die Membran mit Extrazellulärmatrix, die mit serumfreiem Medium im Verhältnis 1:3 gelöst wurde, bedeckt. Die Membran wurde für zehn Minuten bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurden die Wells der unteren Kammerhälfte mit Nährmedium unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von 3PO (10 µM und 100 µM) befüllt, bis sich ein konvexer Flüssigkeitsspiegel bildete. Dies erleichterte das Auflegen der getrockneten Membran und verhinderte die Bildung von Luftblasen. Ausgehend von der Kammermitte wurden das Ober- und Unterteil der Boyden-Kammer fest mit autoklavierten Inbusschrauben verschraubt. Im nächsten Schritt wurden 500 µl Nährmedium in die Wells der oberen Kammerhälfte zugegeben. Zum Äquilibrieren der Membran wurde die Boyden-Kammer für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach konnten die Wells der oberen Kammerhälfte mit weiteren 500 µl Nährmedium unter Zusatz von 3PO in verschiedenen Konzentrationen (10 µM und 100 µM) und 100.000 HCT-116 bzw. HT-29 Zellen befüllt werden. Die fertige Boyden-Kammer wurde für 96 h inkubiert. Um einen eventuellen Effekt von 3PO in Kombination mit ionisierender Strahlung auf die Invasivität von Krebszellen zu untersuchen, wurden die Boyden-Kammer in einem Parallelexperiment 4 h nach der Zugabe von 3PO bestrahlt. Die Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy/min erfolgte mit dem Röntgenbestrahlungssystem RS 225 bei 200 kV, 15 mA und einem 0,5 mm Kupferfilter. Die Bestrahlungszeit betrug sechs Minuten. Dies entsprach einer Gesamtdosis von 6 Gy. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Boyden-Kammer auseinander gebaut. Die einzelnen Wells wurden durchstoßen und das Nährmedium der unteren Kammerhälfte in ein Falcon überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 500 G und 4 °C wurde das Medium auf 1 ml reduziert. Vorhandene Zellen wurden resuspendiert und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Dadurch konnte nachgewiesen werden, wie viele Tumorzellen die Membran, unter verschiedenen Konzentrationen von 3PO, durchdringen konnten. Die Daten wurden graphisch mit GraphPad Prism 8 visualisiert und ausgewertet.

2.2.3 Generierung von PDX-Modellen des KRK in PrkdcScid-Mäusen

2.2.3.1 Haltung von Versuchstieren

Die Haltung der Labormäuse und die Durchführung der Tierversuche erfolgte nach dem deutschen Tierschutzgesetz und der Genehmigung der Niedersächsischen Tierschutzbehörde (Antrag Nr.: 33.19-42502-04-17/2407 und 33.19-42502-04-21/3816). Für die

Generierung von PDX-Modellen des kolorektalen Karzinoms wurden PrkdcScid-Mäuse von Janvier Laboratories verwendet. Isoliert in einen S2-Raum wurden die Versuchstiere in einen sterilen, individuell ventilierten Käfig (IVC) unter standardisierten Bedingungen bei 23 °C +/- 1 °C Raumtemperatur und 12 h Tag-Nacht-Rhythmus, gehalten. Zur eindeutigen Identifizierung der Versuchstiere wurden die Ohren in einem vorgegebenen Schema gelocht. Das Betreten des Raums erfolgte in Schutzkleidung, welche Kittel, Handschuhe, Mundschutz und Haarhaube beinhaltet. Das Öffnen der IVC erfolgte stets unter einer Sicherheitswerkbank mit kontinuierlichem Luftzug, um die immunsupprimierten Tiere vor möglichen pathogenen Erregern zu schützen.

2.2.3.2 Subkutane Tumorumplantation

Nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens sieben Tagen in der Zentralen Tiereinheit der Universitätsmedizin Göttingen konnten PrkdcScid-Mäuse zur Generierung von PDX-Modellen des KRK verwendet werden. Das Tumormaterial der Patient*innen wurde nach der operativen Resektion umgehend weiterverarbeitet. Dafür wurde das Gewebe in gekühltem Medium gelagert und anschließend mit Hilfe eines Skalpells in 2 x 2 mm Stücke zerkleinert. Zur analgetischen Behandlung wurde den Versuchstieren 30 Minuten vor der Transplantation Metamizol mit einer Pipette oral verabreicht. Die Einleitung der Narkose erfolgte durch eine Initialdosis von 4 % und anschließender Erhaltungsdosis von 1,5 bis 2,5 % Isofluran. Das Auftragen von Bepanthen nach der Einleitung der Narkose schützte die Augen der Mäuse vor Austrocknung. Durch die Überprüfung der Atemtiefe und Frequenz sowie des Zwischenzehenreflexes wurde der Status der Narkose beurteilt. War die Narkose tief genug, konnte die Implantation durchgeführt werden. Dafür wurden die Mäuse zuerst an beiden Flanken rasiert. Nach einem kleinen Hautschnitt an beiden Flanken mit anschließender Präparation einer Hauttasche konnten die Tumorgewebsstücke vorsichtig subkutan (s. c.) platziert werden. Für den Verschluss der Wunden wurden die Wundränder fest mit Hilfe eines Tackers durch 9 mm Clips verschlossen. Diese konnten sieben Tage nach der Transplantation entfernt werden. Zur Schmerzlinderung erfolgte nach der Implantation die s. c. Injektion von Caprofen. Zum Schutz der immundefizienten Versuchstiere wurde ausschließlich steriles Operationsbesteck verwendet. Im Anschluss an die Implantation folgte die Überwachung der Mäuse bis zum vollständigen Abbau der Anästhesie und bis zur Wiederherstellung des natürlichen Verhaltens der Tiere. Durch die Lagerung auf einer Wärmeplatte wurde die Körpertemperatur während der Implantation konstant bei 37 °C ± 0,5 °C gehalten. Alle Versuchsmäuse wurden nach der Transplantation täglich beobachtet und auf Bewegungseinschränkungen, das Verhalten der Tiere, Anzeichen von Schmerzen und

Veränderungen an der Implantationsstelle überprüft. Weiterhin wurde das Gewicht wöchentlich kontrolliert.

2.2.3.3 Passagierung von Tumoren

Erreichte der Tumor einer Flanke ein Volumen von 1000 mm³ wurde dieser in die nächste Mausgeneration implantiert. In einer mit Isofluran begasten Box wurden die Versuchsmäuse narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden die Tumoren explantiert. Dafür wurde die Hauttasche oberhalb des sichtbaren Tumors mit einer Schere eröffnet. Der Tumor wurde mit einer Pinzette entfernt. Neben der Generierung von Tumorgewebe für die Transplantation wurden Tumorgewebsstücke in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in 4 % Paraformaldehyd fixiert oder in einem Einfriermedium gelagert. Ab der zweiten Passage des Tumors wurden die Mäuse für Therapieversuche eingesetzt.

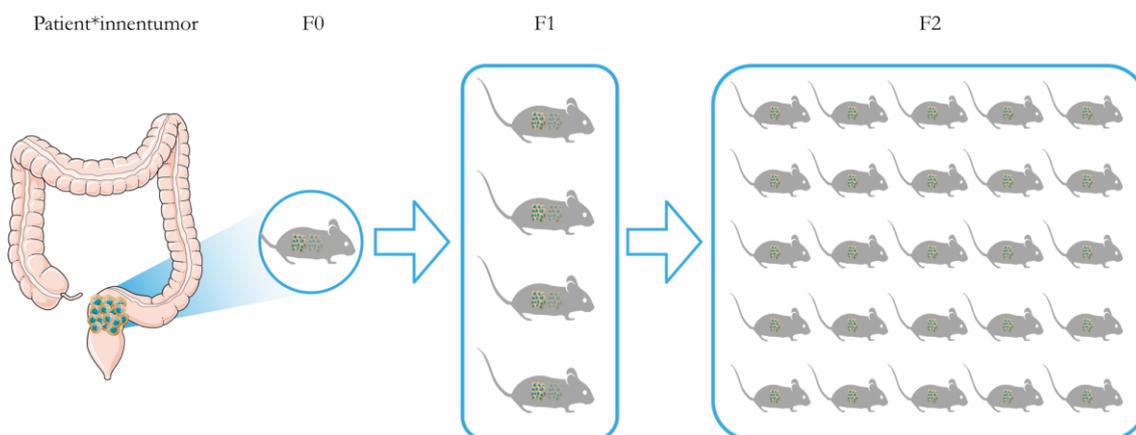


Abb. 5 Schematische Darstellung der Generierung von PDX-Mausmodellen des KRK. Nach der Isolierung des Tumorgewebes wird dieses subkutan in beide Flanken einer Maus transplantiert (F0 entspricht dabei der Passage 0). Nach anschließendem Wachstum bis 1000 mm³ wird der Tumor explantiert und in die nächsten Generationen implantiert (F1 – Passage 1). Ab der 2. Passage (F2) wurden die Versuchstiere in Behandlungskohorten eingeteilt und therapiert. (Die Abbildung des Kolons wurde erstellt mit Hilfe von Vektoren aus dem Servier Medical Art. https://smart.servier.com/smart_image/colon/; aufgerufen am 01.09.2021)

2.2.3.4 Messung subkutaner Tumoren

Die Tumoren der Mäuse wurden dreimal in der Woche vermessen. Dafür wurde eine Schiebellehre verwendet. Anhand der Formel

$$\frac{\text{Länge} \times \text{Breite}^2}{2}$$

wurde das Tumolvolumen berechnet. Erreichten die Tumoren der F2-Generation ein Volumen von 200 mm³ wurden die Versuchstiere randomisiert in Behandlungsgruppen eingeteilt.

In einer Behandlungsgruppe befanden sich 4 – 7 Mäuse. Im Verlauf der Behandlung wurden die Tumordimensionen der Mäuse einer Versuchsgruppe gemittelt. Erreichten die Tumoren der Versuchstiere vor Therapieende eine Größe von 1500 mm³ wurden diese vorzeitig aus dem Experiment herausgenommen und getötet. Zur Analyse des Tumoransprechens auf die Therapie wurde der *treatment to control*(t/c)-Wert zu einem bestimmten Behandlungszeitpunkt berechnet. Der t/c-Wert wird in Prozent angegeben. Die Berechnung erfolgt aus dem mittleren Tumordimensionen einer Behandlungskohorte (t) in Relation zum mittleren Tumordimensionen der Kontrollkohorte (c). Er zeigt somit an, wie sich das Volumen einer Therapiegruppe relativ gegenüber der Kontrollgruppe unterscheidet.

2.2.3.5 Tumorbehandlung von PrkdcScid-Mäusen

Verwendete Medikamente wurden den Versuchstieren intraperitoneal (i. p.) in den Unterbauch injiziert. Die Radiatio mit einer Gesamtdosis von 25,2 Gy wurde fünfmal wöchentlich über einen Zeitraum von drei Wochen mit einer jeweiligen Einzeldosis von 1,8 Gy durchgeführt. Verwendet wurde das RS 225 X-Ray Bestrahlungssystem. Während des Bestrahlungsvorgangs wurden die Versuchstiere mittels Isofluran narkotisiert. Mit Hilfe eines zurechtgeschnittenen Bleistücks wurde der Körper der Versuchsmäuse vor der Strahlung geschützt.

2.2.3.6 Therapieschema, Therapeutische Substanzen, Dosierungen und Applikationswege

Nach den Schemas wurde die Therapie der RT-Kohorte der PDX-Tumoren HROC239 (Abb. 6 und Tbl. 10) und RCT-Kohorte der PDX-Tumoren Gö Pt. 23 durchgeführt (Abb. 7 und Tbl. 10).

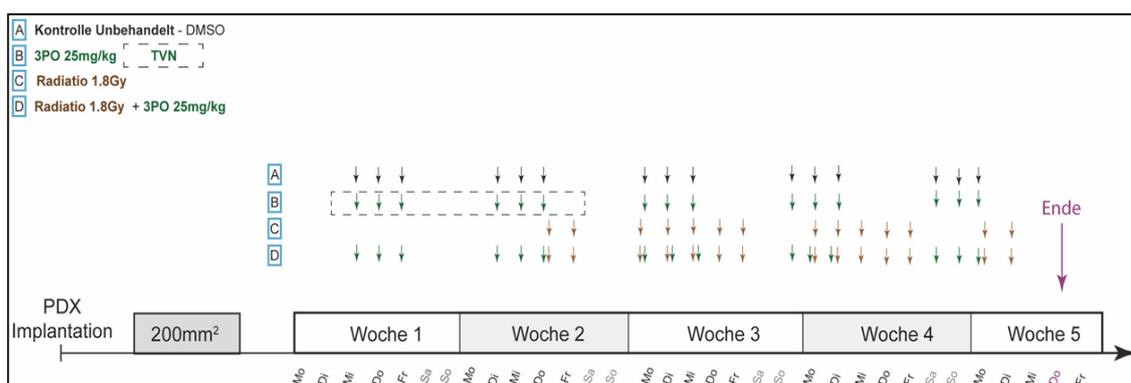


Abb. 6 Therapieschema der PDX-Tumoren des KRK HROC239. Die Pfeile geben die Gabe der jeweiligen Substanzen an.

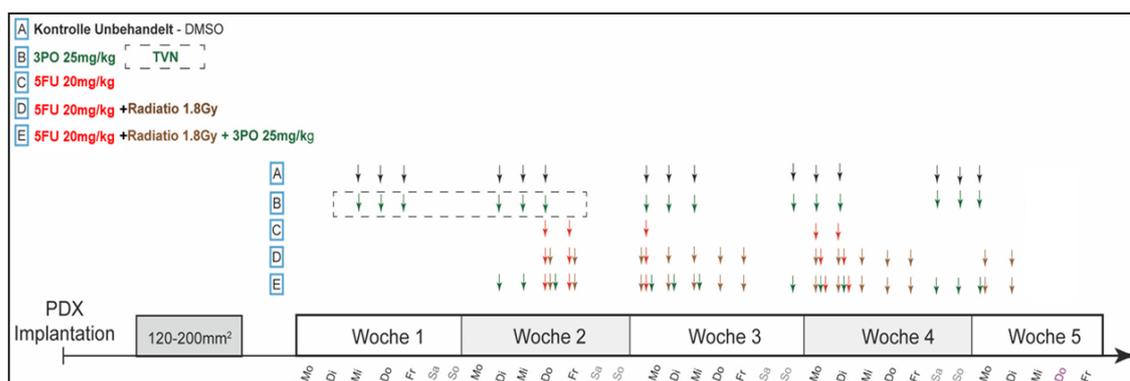


Abb. 7 Therapieschema der PDX-Tumoren des KRK GÖ Pt. 23. Die Pfeile geben die Gabe der jeweiligen Substanzen an.

Tbl. 10 Verwendete therapeutische Substanzen, Dosierungen und Applikationsweg

Substanz	Dosierung	Applikationsweg	Behandlungsschema
3PO	25 mg/kg	i. p.	Tag: 1 – 3; 7 – 9; 13 – 15; 19 – 21; 25 – 27
5FU	20 mg/kg	i. p.	Tag: 10 + 11; 22 + 23

3PO wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. 5FU wurde in Natriumchlorid (NaCl) gelöst. Die Behandlung der Kontrollgruppen wurde dementsprechend mit DMSO und NaCl durch eine i. p. Gabe durchgeführt.

2.2.3.7 Aufbereitung von Tumorgewebe und Paraffineinbettung

Am Ende der Tierversuche wurde den Versuchstieren vor ihrer Tötung 100 mg/kg Bromdesoxyuridin (BrdU) und 60 mg/kg Pimonidazol i. p. injiziert. Die Gabe von BrdU und Pimonidazol erfolgte zeitgleich 90 Minuten vor Tötung der Versuchsmäuse. Nach der Abtötung der Tiere wurden die Tumoren vollständig reseziert. Das explantierte Tumorgewebe wurde in 4 % Paraformaldehyd fixiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Einfriermedium für die Kryokonservierung vorbereitet.

Wie beschrieben, folgte nach Explantation der Tumoren die sofortige Fixierung des Tumorgewebes in einer 4 % Paraformaldehyd-Lösung. Diese wurde bei 4 °C über Nacht gelagert. Auf die Überführung in 70 % Ethanol folgte die weitere Verarbeitung des Gewebes nach dem Protokoll zur Paraffineinbettung (Tbl. 11). Die Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert. Für den darauffolgenden Färbeprozess wurden 2 µm dicke Tumorgewebschnitte durch ein Schlittenmikrotom angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen.

Tb1. 11 Protokoll zur Paraffineinbettung

Reagenz	Inkubationszeit (min)
Ethanol 70 %	45
Ethanol 86 %	45
Ethanol 96 %	45
Ethanol 96 %	60
Ethanol 100 %	60
Ethanol 100 %	60
Ethanol 100 %	60
Xylol	45
Xylol	70
Xylol	75
Paraffin	60
Paraffin	60
Paraffin	60

2.2.3.8 Histologische und Immunhistochemische Färbungen der Tumorgewebsschnitte

2.2.3.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) stellt eine geeignete histologische Übersichtsfärbung dar. Dafür wurden die Tumorgewebsschnitte nach dem Protokoll zur Entparaffinierung und Rehydrierung behandelt (Tb1. 12).

Tb1. 12 Protokoll zur Entparaffinierung und Rehydrierung der Tumorgewebsschnitte

Reagenz	Inkubationszeit (min)
Xylol	5
Xylol	5
Ethanol 100 %	1
Ethanol 100 %	1
Ethanol 96 %	1
Ethanol 96 %	1
Ethanol 75 %	1
dH ₂ O	1

Anschließend erfolgte die Kernfärbung durch Hämalaun nach Mayer und eine darauffolgende Spülung mit deionisiertem Wasser (dH₂O). Für das nachfolgende Bläuen der Schnitte wurden diese für fünf Minuten unter warmem Leitungswasser gespült. Als nächstes wurden die Proben für 1 Minute mit Eosin gefärbt und danach erneut mit dH₂O gespült. Im nächsten Schritt wurden die Proben dehydriert (Tbl. 13). Zum Abschluss erfolgte das dauerhafte Eindecken der Tumorgewebsschnitte mit Vitro-Clud.

Tbl. 13 Protokoll zur Dehydration der Tumorgewebsschnitte

Reagenz	Inkubationszeit (min)
Ethanol 75 %	1
Ethanol 96 %	1
Ethanol 96 %	1
Ethanol 100 %	1
Ethanol 100 %	2
Xylol	2
Xylol	2

2.2.3.8.2 Pimonidazol- und BrdU-Färbung

Für die nachfolgend beschriebenen Färbungen wurden die Tumorgewebsschnitte nach dem Protokoll zur Entparaffinierung und Rehydrierung behandelt (Tbl. 12).

Zur Wiederherstellung der Immunreaktivität des in Paraffin eingebetteten Gewebes wurde dies in Citrat Puffer (pH 6,0) für zwei Minuten im Dampfdrucktopf gekocht. Nachdem die Schnitte wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden diese für zwei Minuten mit dH₂O gewaschen. Die Blockade der endogenen Peroxidase erfolgte durch die fünfzehnminütige Zugabe von 3 % H₂O₂. Nach einem erneuten Waschvorgang mit dH₂O und PBS (Pimonidazol) bzw. mit *Tris-buffered saline* (TBS) (BrdU) wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Blockierungslösung aus 3 % Bovinen Serumalbumin (BSA) inkubiert. Nach Entfernung der Blockierungslösung wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Kap. 2.1.3) zugegeben und über Nacht in einer feuchten, dunklen Kammer bei 4 °C (Pimonidazol) bzw. für 2 h bei Raumtemperatur (BrdU) inkubiert. Folgend auf einen dreimal durchgeführten fünfminütigen Waschvorgang in PBS (Pimonidazol) bzw. TBS (BrdU) wurde der Sekundärantikörper in der jeweiligen Verdünnung (siehe Kap. 2.1.3) aufgetragen und für weitere 2 h (Pimonidazol) bzw. 30 Minuten (BrdU) bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Visualisierung der Farbreaktion wurde das Bright-DAB Substrate Kit verwendet. Die Lösung wurde frisch hergestellt und für acht Minuten auf die Schnitte gegeben. Die

Farbreaktion wurde durch einen erneuten Waschvorgang des Tumorgewebsschnitts in dH₂O gestoppt. Die Schnitte wurden zudem mit Mayer's Hämatoxylin ko-gefärbt. Zum Abschluss wurden die Tumorgewebsschnitte nach dem Protokoll zur Dehydration behandelt (Tbl. 13) und in Vitro-Clud eingedeckt.

2.2.3.8.3 CD31-Immunfluoreszenzfärbung

Zur Wiederherstellung der Immunreaktivität des in Paraffin eingebetteten Gewebes wurden die Schnitte in Retrieval-Solution high pH für 20 Minuten im Dampfgerar gekocht. Nachdem die Schnitte fünf Minuten bei Raumtemperatur abkühlten, folgte ein zweiminütiger Waschvorgang mit dH₂O. Die Blockade der endogenen Peroxidase erfolgte durch die zwanzigminütige Zugabe von 3 % H₂O₂. Nach einem erneuten Waschvorgang mit dH₂O und TBS wurden die Schnitte für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Blockierungslösung aus 3 % BSA inkubiert. Nach Entfernung der Blockierungslösung wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Kap. 2.1.3) zugegeben und über Nacht in einer feuchten sowie dunklen Kammer bei 4 °C gelagert. Folgend auf einen dreimal fünfminütigen Waschvorgang in *Tris-buffered saline with Tween20* (TBS-T) wurde der Sekundärantikörper in der Verdünnung (siehe Kap. 2.1.3) aufgetragen und für weitere 45 Minuten inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschvorgang mit TBS-T erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 1:100 verdünnter Horseradish Peroxidase Streptavidin. Im Anschluss an einem erneuten Waschvorgang mit TBS-T erfolgte die Zugabe von Cy3 in der Verdünnung 1:50 für zehn Minuten. Auf einen erneuten Waschvorgang folgte die Kernfärbung mittels 30-minütiger Inkubation mit Hoechst. Nach einer letzten Spülung mit TBS-T erfolgte die Eindeckung mit Prolong Gold Antifade Reagent und Deckglas.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Für die statistischen Analysen der Versuche wurde der t-Test verwendet (Kim 2015). Die statistisch signifikanten Unterschiede der Zellüberlebenskurven des Koloniebildungstests und des Wundheilungs-Assay wurden per zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen (ANOVA) ermittelt (Brasemann et al. 2015). Die Daten und Abbildungen der *In-vitro*-Experimente werden als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*) von mindestens drei unabhängigen Durchführungen dargestellt. Die Daten und Abbildungen der tierexperimentellen Versuche werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Ermittelte p-Werte < 0,05 werden mit *, p-Werte < 0,01 mit **, p-Werte < 0,001 mit *** und p-Werte < 0,0001 **** markiert.

3 Ergebnisse

Bisher fehlen Untersuchungen der Auswirkung einer PFKFB3-Blockade durch 3PO auf Zelllinien des KRK. Das Ziel war daher, die Wirkung von 3PO unter Verwendung verschiedener Konzentrationen *in vitro* zu charakterisieren. Neben Analysen zur Zellproliferation und Induktion von Zelltod wurde auch der Einfluss von 3PO auf die Fähigkeit zur Migration und Invasion von Krebszellen überprüft. Um den Effekt einer Therapie bestehend aus 3PO in Kombination mit ionisierender Strahlung zu untersuchen, wurde ein Koloniebildungstest durchgeführt. Letztendlich erfolgte die Etablierung von PDX-Tumoren des KRK, um die Wirkung von 3PO in Kombination mit RT und RCT *in vivo* zu evaluieren.

3.1 Einfluss des PFKFB3-Inhibitors 3PO auf HT-29, HCT-116, SW-1463 und HUVEC *in vitro*

Dieser Abschnitt beschreibt die Effekte einer PFKFB3-Blockade durch 3PO auf Zelllinien des KRK und HUVEC allein und in Kombination mit ionisierender Strahlung.

3.1.1 Echtzeit-Zellanalyse von HCT-116, HT-29 und HUVEC unter Therapie mit 3PO

Der Einfluss einer PFKFB3-Blockade durch 3PO auf den Zustand von Zellen wurde in Echtzeit mittels eines xCELLigence-Assays analysiert (Abb. 8 A – C). Über einen Zeitraum von 96 h wurden mit der xCELLigence-Software Veränderungen der Zellmorphologie, Zellzahl und Zelladhäsion durch Messung der Impedanz aufgezeichnet. Dieser Versuch eröffnete eine erste Möglichkeit das Verhalten, der kolorektalen Krebszelllinien HCT-116, HT-29 sowie HUVEC während einer Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von 3PO, zu untersuchen. Während des Versuchs führten Veränderungen der Zellgröße, Zellanzahl und Zelladhäsion zu Veränderungen des Zellindex. Die Tumorzelllinien HCT-116 und HT-29 zeigten einen kontinuierlichen Anstieg des Zellindex in der Kontrollprobe. Die Behandlung mit 10 μM 3PO führte im Vergleich zu höheren Konzentrationen zu einem geringeren Abfall des Zellindex. Die morphologischen und proliferativen Eigenschaften der kolorektalen Krebszellen blieben erhalten. Unter Verwendung höherer Konzentrationen von 3PO (25 μM , 50 μM und 75 μM) fiel der Zellindex vollständig ab. Zu Beginn des xCELLigence-Assays zeigten HUVEC eine steil verlaufende Zunahme des Zellindex in der Kontrolle. Unter Zugabe verschiedener Konzentrationen von 3PO verlief der Anstieg flacher. In den hohen Konzentrationen von 50 μM und 75 μM 3PO ergab sich eine deutliche Abnahme des Zellindex. Nach 48 h erfolgte die erneute Zugabe von 3PO. Darunter fiel bei HUVEC ein

Abfall des Zellindex ab 10 μM 3PO im Vergleich zur Kontrollprobe auf. Dieser Effekt wurde bei den Zelllinien des KRK nicht im gleichen Ausmaß beobachtet. Der ursprüngliche Zellindex der kolorektalen Krebszellen HCT-116 und HT-29 konnte kurze Zeit nach Applikation von 3PO wieder erreicht werden. HUVEC hingegen benötigten einen längeren Zeitraum, um den Zellindex wieder zu steigern. Die gemessenen Daten zeigten, dass 3PO eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Zelllinien HCT-116, HT-29 sowie auf HUVEC besitzt. Zusätzliche Untersuchungen waren notwendig, um die Auswirkungen genauer charakterisieren zu können.

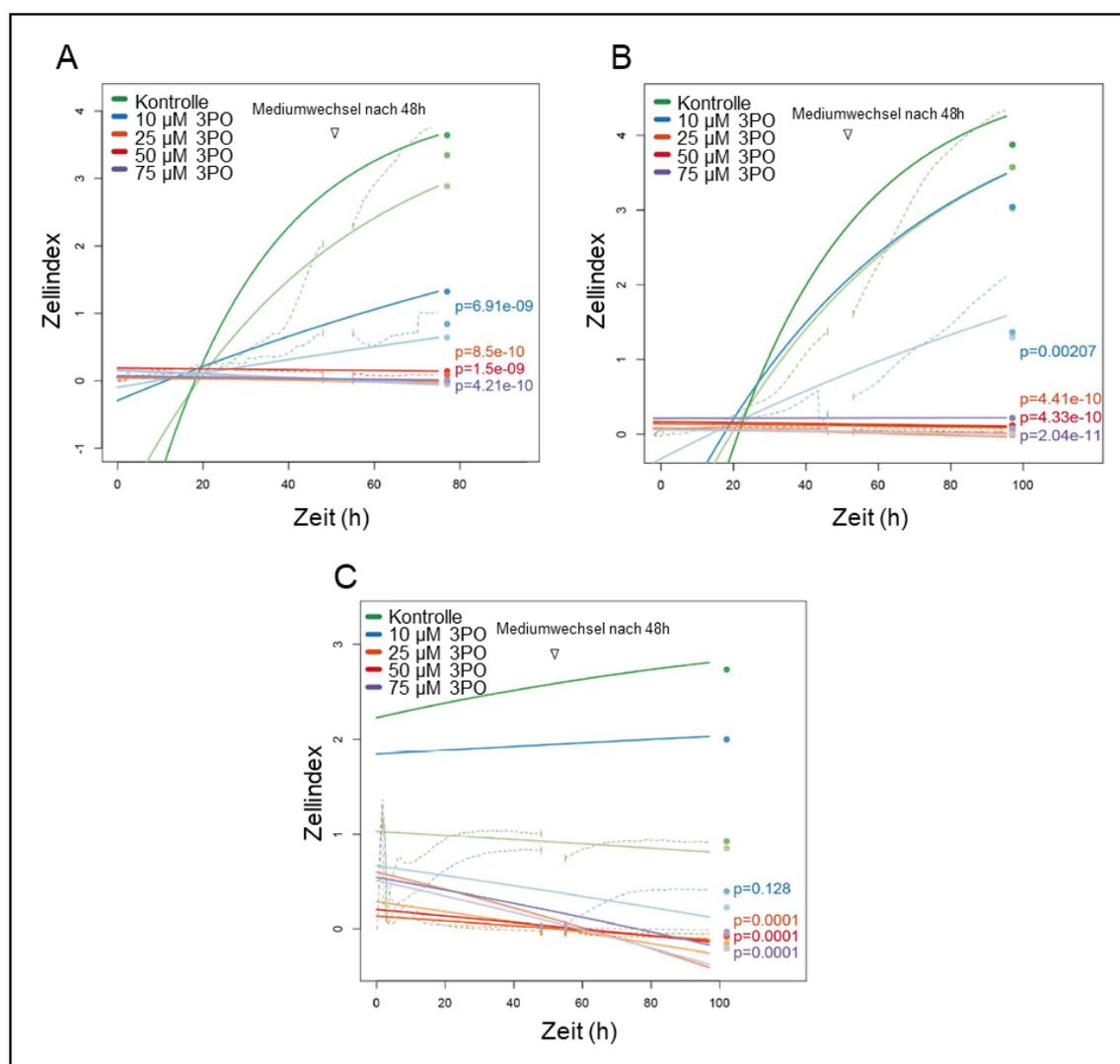


Abb. 8 (A – C) Effekt einer PFKFB3-Blockade auf die Zellproliferation, Zellviabilität, Zella-dhäsion und Zellmorphologie. Abgebildet ist der in Echtzeit analysierte Zellindex von HCT-116 (A), HT-29 (B) und HUVEC (C) während einer Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von 3PO über einem Zeitraum von 96 h (durchgezogene Linie). Die verschiedenen Bedingungen wurden mittels Sättigungskurve (gestrichelte Linien) und 80 h Zeitpunkt (Punkte) untereinander verglichen.

3.1.2 Koloniebildungstest

Ein wesentlicher Bestandteil der Therapie bei Patient*innen mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom stellt die neoadjuvante RCT dar. Um die Strahlenwirkung auf kolorektale Krebszelllinien HCT-116, HT-29 und SW-1463 in Kombination mit einer Therapie aus 3PO und RT zu untersuchen, wurde ein Koloniebildungstest durchgeführt. In allen verwendeten Zelllinien wurde durch den Einfluss von 3PO eine signifikante Abnahme der Überlebensfraktion der Zellen beobachtet (Abb. 9 A – C). Dieses Ergebnis lässt auf einen radiosensibilisierenden Effekt von 3PO schließen. In der Kontrollprobe von HCT-116 sank die Überlebensfraktion von 100 % (0 Gy) über 39,9 % (2 Gy) bis auf 8 % (8 Gy) ab. In Kombination mit 3PO wurde über alle Dosisbereiche hinweg eine stärkere Abnahme der Überlebensfraktion von 100 % (0 Gy) über 28 % (2 Gy) auf 4 % (8 Gy) gemessen. Die Überlebensfraktion der Kontrollprobe von HT-29 nahm von 100 % (0 Gy) über 83 % (2 Gy) bis auf 46 % (8 Gy) ab. In Kombination mit 3PO wurde im höheren Dosisbereich (6 Gy und 8 Gy) eine stärkere Abnahme der Überlebensfraktion beobachtet. Dabei nahm die Überlebensfraktion von 100 % (0 Gy) über 85 % (2 Gy) auf 35 % (8 Gy) ab. Während der Behandlung im niedrigen und mittleren Dosisbereich (1 Gy, 2 Gy und 4 Gy) wurde unter Einfluss von 3PO kein Unterschied festgestellt. Die Überlebensfraktion der Kontrollprobe von SW-1463 sank von 100 % (0 Gy) über 88 % (2 Gy) bis auf 31 % (8 Gy) ab. In Kombination mit 3PO wurde eine stärkere Abnahme der Überlebensfraktion in allen Dosisbereichen beobachtet. Die Überlebensfraktion nahm dabei von 100 % (0 Gy) über 66 % (2 Gy) auf 13 % (8 Gy) ab.

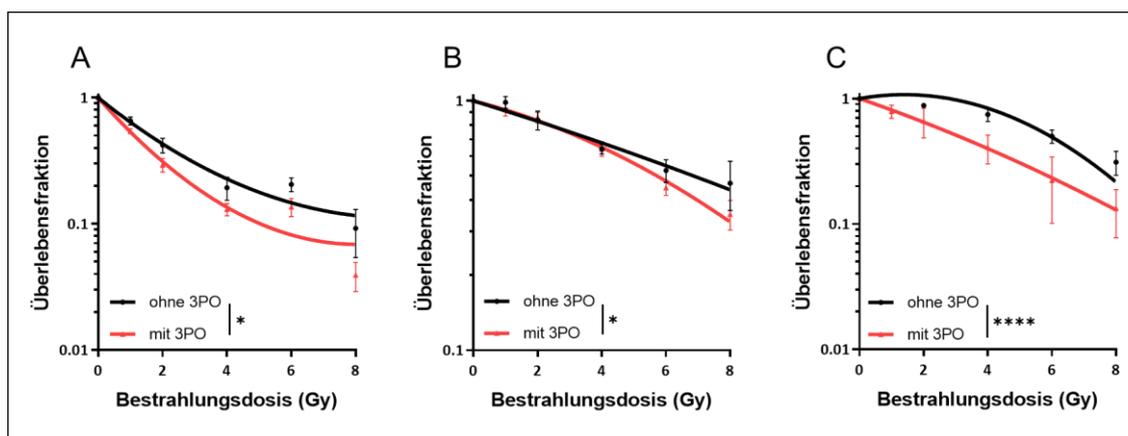


Abb. 9 (A – C) Koloniebildungstest während einer Blockade von PFKFB3 durch 2,5 μ M 3PO. Abgebildet sind die Zellüberlebenskurven von HCT-116 (A), HT-29 (B) und SW-1463 (C) während einer Behandlung mit und ohne 3PO.

3.1.3 Einfluss von 3PO auf die Zellproliferation von HCT-116, HT-29 und HUVEC nach 6 h und 24 h *in vitro*

Ein CTB-Assay wurde durchgeführt, um die Auswirkung einer PFKFB3-Blockade auf die Proliferation von kolorektalen Krebszelllinien sowie HUVEC zu untersuchen. Die Analysen zur Zellproliferation wurden nach einer Inkubationsdauer von 6 h (Abb. 10 A – C) und 24 h (Abb. 11 A – C) durchgeführt. Bei einer Inkubationszeit von 6 h zeigten alle drei Zelllinien mit steigender Konzentration von 3PO eine signifikante Abnahme der Proliferation. Ein signifikanter Rückgang der Proliferationsrate von HCT-116 war ab einer Konzentration von 25 μM 3PO nachweisbar. Eine signifikante Reduktion der Zellproliferation von HT-29 wurde bei einer Konzentration von 50 μM 3PO beobachtet. HUVEC zeigten ab einer Konzentration von 30 μM eine signifikante Abnahme der Proliferation. Untersuchungen der Zelllinien mit einer Inkubationszeit von 24 h ergaben bei HCT-116 und HT-29 einen konzentrationsabhängigen Rückgang der Proliferation beginnend ab einer Konzentration von 25 μM 3PO für HCT-116 und 50 μM 3PO für HT-29. Eine Reduktion der Proliferationsrate von HUVEC war ab einer Konzentration von 50 μM 3PO signifikant.

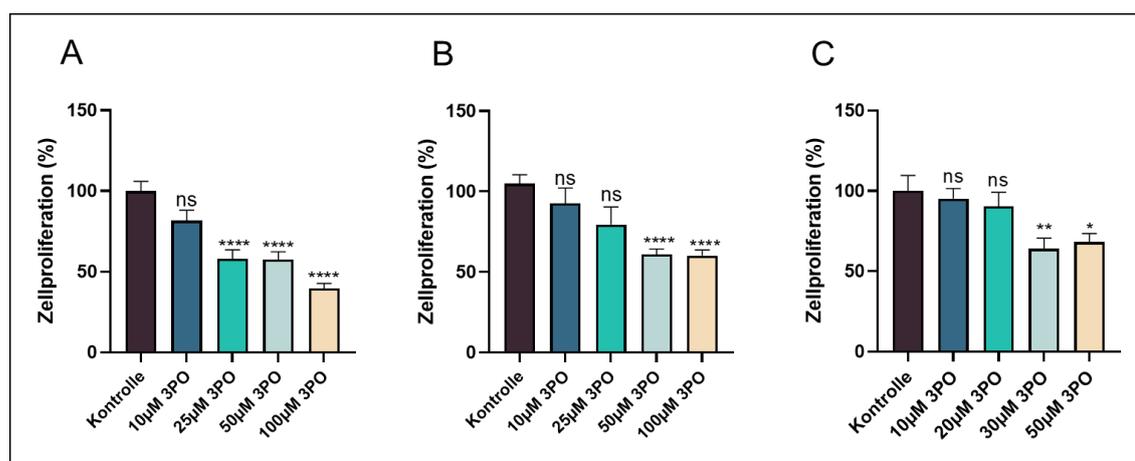


Abb. 10 (A – C) Effekt einer PFKFB3-Blockade auf die Zellproliferation nach 6 h. Dargestellt ist die Zellproliferationsrate von HCT-116 (A), HT-29 (B) und HUVEC (C) nach 6 h Inkubationszeit. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von 3PO behandelt. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzmesswerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Zellproliferation der behandelten Zellen wird relativ zu der Kontrollgruppe (100 %) in Prozent angegeben.

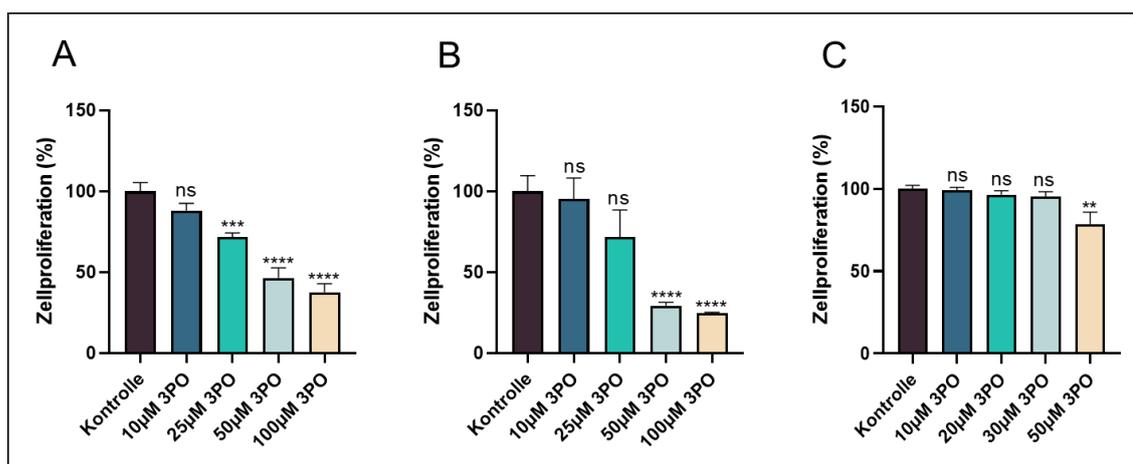


Abb. 11 (A – C) Effekt einer PFKFB3-Blockade auf die Zellproliferation nach 24 h. Dargestellt ist die Zellproliferationsrate von HCT-116 (A), HT-29 (B) und HUVEC (C) nach 24 h Inkubationszeit. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von 3PO behandelt. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzmesswerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Zellproliferation der behandelten Zellen wird relativ zu der Kontrollgruppe (100 %) in Prozent angegeben.

3.1.4 Auswirkung der Kombinationstherapie von 3PO und Bestrahlung auf die Zellproliferation von HCT-116, HT-29 und HUVEC nach 24 h *in vitro*

Um zu überprüfen welchen Effekt eine PFKFB3-Blockade in Kombination mit Bestrahlung auf die Zellproliferation ausübt, wurde ein CTB-Assay durchgeführt. Die Zelllinien HCT-116, HT-29 und HUVEC wurden mit einer Kombinationstherapie bestehend aus ansteigenden Konzentrationen von 3PO und einer Einzeldosis von 6 Gy behandelt. Die alleinige Therapie mit ionisierender Strahlung ergab bei allen Zelllinien eine signifikante Abnahme der Proliferation (Abb. 12 A – C). Bei den Zelllinien des KRK, HCT-116 und HT-29, wurde ein signifikanter Rückgang der Proliferation mit steigender Konzentration von 3PO gegenüber der alleinigen RT beobachtet. HCT-116 Zellen zeigten ab einer Konzentration von 25 μM eine zusätzliche Reduktion der Proliferation im Vergleich zur alleinigen RT (Abb. 12 A). Bei HT-29 Zellen wurde ab einer Konzentration von 50 μM 3PO eine signifikante Abnahme der Zellproliferation gegenüber der alleinigen RT gemessen (Abb. 12 B). Ein signifikanter Rückgang der Proliferation von HUVEC unter Therapie mit 3PO und Bestrahlung konnte gegenüber der alleinigen RT nicht nachgewiesen werden (Abb. 12 C).

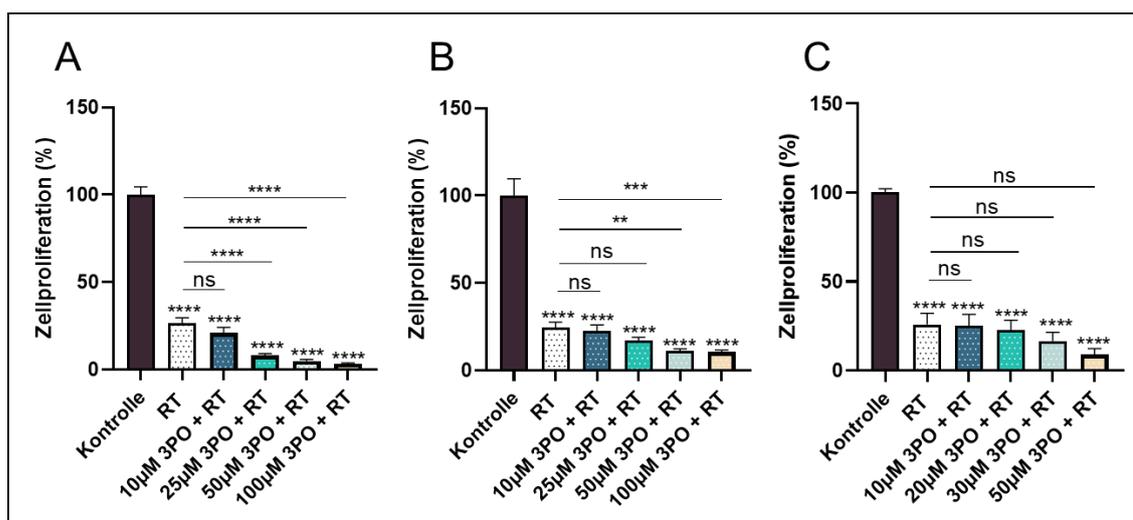


Abb. 32 (A – C) Effekt einer PFKFB3-Blockade in Kombination mit Bestrahlung auf die Zellproliferation nach 24 h. Dargestellt ist die Zellproliferationsrate von HCT-116 (A), HT-29 (B) und HUVEC (C) nach 24 h Inkubationszeit. Die Bestrahlung der Zellen mit einer Dosis von 6 Gy wurde 4 h nach der Zugabe von 3PO durchgeführt. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzmesswerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Zellproliferation der behandelten Zellen wird relativ zu der Kontrollgruppe (100 %) in Prozent angegeben.

3.1.5 Einfluss von 3PO auf den Zelltod von HCT-116, HT-29 und HUVEC *in vitro*

Der LDH-Assay stellt eine geeignete Methode dar, um die Induktion des Zelltods während einer Therapie mit 3PO zu untersuchen. Eine Abnahme der Anzahl von Zellen kann einerseits durch eine reduzierte Zellproliferation oder andererseits durch einen gesteigerten Zelltod bedingt sein. Durch die Freisetzung von LDH bei der Lyse von Zellen können Aussagen zum Zelltod abgeleitet werden. Nach einer Inkubationsdauer von 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von 3PO wiesen alle drei Zelllinien eine signifikante Erhöhung der LDH-Freisetzung auf (Abb.13 A – C). Diese war bei HCT-116 Zellen beginnend ab einer Konzentration von 25 µM signifikant nachweisbar. HT-29 Zellen und HUVEC zeigten ab 50 µM 3PO eine signifikant erhöhte Freisetzung von LDH als Surrogatmarker für behandlungsassoziierte Toxizität.

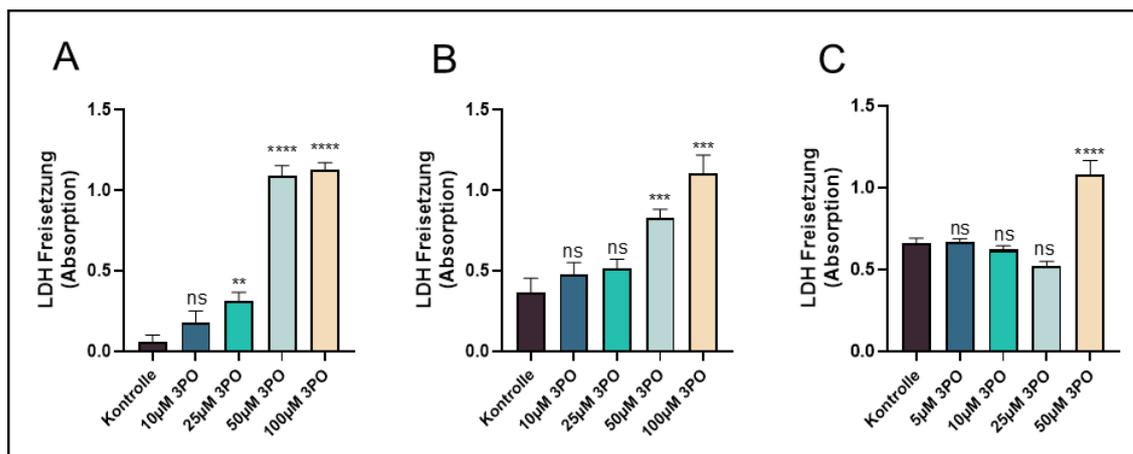


Abb. 13 (A – C) Effekt einer PFKFB3-Blockade auf den Zelltod nach 48 h. Dargestellt ist die LDH-Freisetzung von HCT-116 (A), HT-29 (B) und HUVEC (C) nach 48 h Inkubationszeit unter Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von 3PO. Abgebildet sind die mittleren Absorptionswerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.1.6 Auswirkung der Kombinationstherapie von 3PO und Bestrahlung auf den Zelltod von HCT-116, HT-29 und HUVEC *in vitro*

Um zu überprüfen welchen Effekt eine PFKFB3-Blockade in Kombination mit Bestrahlung auf den Zelltod besitzt, wurde ein LDH-Assay durchgeführt. Die kolorektalen Krebszelllinien HCT-116 und HT-29 sowie HUVEC wurden mit einer Kombinationstherapie aus ansteigenden Konzentrationen von 3PO und ionisierender Strahlung mit einer Einzeldosis von 6 Gy behandelt. Die alleinige Behandlung mit ionisierender Strahlung führte bei keiner der untersuchten Zelllinien zu einer erhöhten LDH-Freisetzung (Abb. 14 A – C). Gegenüber der alleinigen RT wurde unter zusätzlicher Gabe von 3PO bei beiden Tumorzelllinien eine konzentrationsabhängige Steigerung der LDH-Freisetzung gemessen (Abb. 14 A – B). Eine erhöhte LDH-Freisetzung war ab einer Konzentration von 25 µM für HCT-116 n und von 50 µM für HT-29 messbar. HUVEC wiesen signifikante Veränderungen des LDH-Spiegels ab einer Konzentration von 50 µM 3PO gegenüber der alleinigen RT auf (Abb. 14 C).

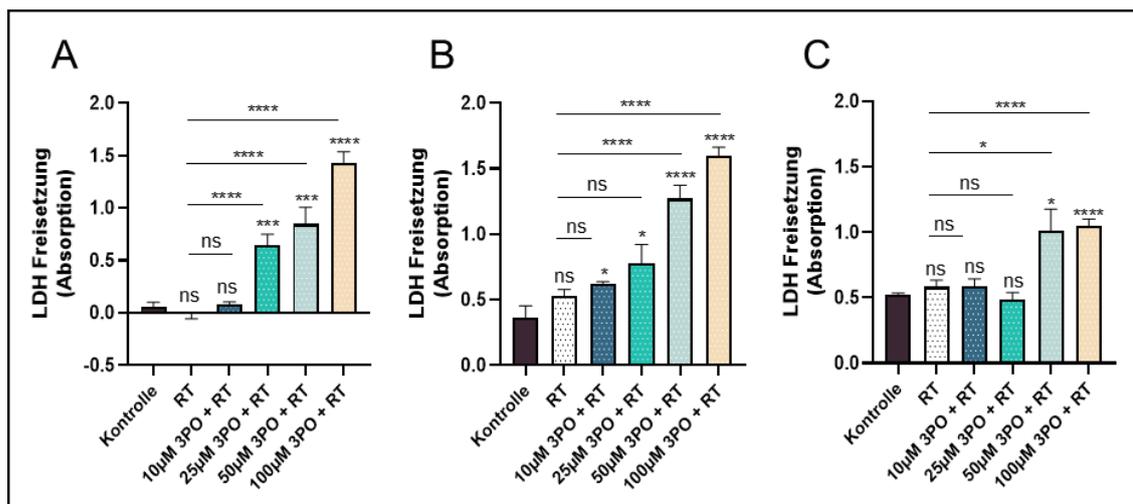


Abb. 14 (A – C) Effekt einer PFKFB3-Blockade in Kombination mit Bestrahlung auf den Zelltod nach 48 h. Dargestellt ist die LDH-Freisetzung von HCT-116 (A), HT-29 (B) und HUVEC (C) nach 48 h unter Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von 3PO. Die Bestrahlung der Zellen mit einer Dosis von 6 Gy wurde 4 h nach der Zugabe von 3PO durchgeführt. Abgebildet sind die mittleren Absorptionswerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.1.7 Einfluss von 3PO auf die Migration von HCT-116 und HT-29 *in vitro*

Tumorzellen sind in der Lage, mittels Migration ihre Position im Gewebe zu verändern. Diese Fähigkeit führt dazu, dass Krebszellen in Blut- und Lymphgefäße einwandern und im gesamten Blutkreislauf zirkulieren können. Dies kann zur Entstehung von Metastasen in entfernten Organen führen. Voraussetzung für die Motilität von Krebszellen ist eine dynamische Umordnung der Aktinfilamente. Durch Ausstülpungen (Pseudopodia) können sich Zellen an die extrazelluläre Matrix anheften. In Folge der anschließenden Kontraktion des Zellkörpers ist die Zelle in der Lage sich fortzubewegen. Die Motilität von Krebszellen setzt eine verstärkte glykolytische Aktivität der Zelle voraus. Um die Auswirkung einer PFKFB3-Blockade durch 3PO auf die Migration von HCT-116 und HT-29 Zellen zu untersuchen, wurde ein Wundheilungs-Assay durchgeführt (Abb. 15 A – D). HCT-116 zeigten bei einer Konzentration von 25 µM 3PO eine signifikante Abnahme der Migration (Abb. 15 A). Die Blockade von PFKFB3 durch 3PO beeinträchtigt auch die Migration von HT-29 Zellen (Abb. 15 B). Ein signifikanter Rückgang der Migration wurde bei einer Konzentration von 25 µM 3PO gemessen. Die Fähigkeit zur Migration der Tumorzelllinien wurde durch die Größe der zellfreien Fläche zwischen den Zellfronten verdeutlicht. Im zeitlichen Verlauf wurde die Fläche zwischen den Zellfronten durch migrierende Zellen geschlossen. Die repräsentativen Aufnahmen nach 30 h lassen Unterschiede in der Größe des zellfreien Areals zwischen der Kontrolle und 25 µM 3PO erkennen (Abb. 15 C – D).

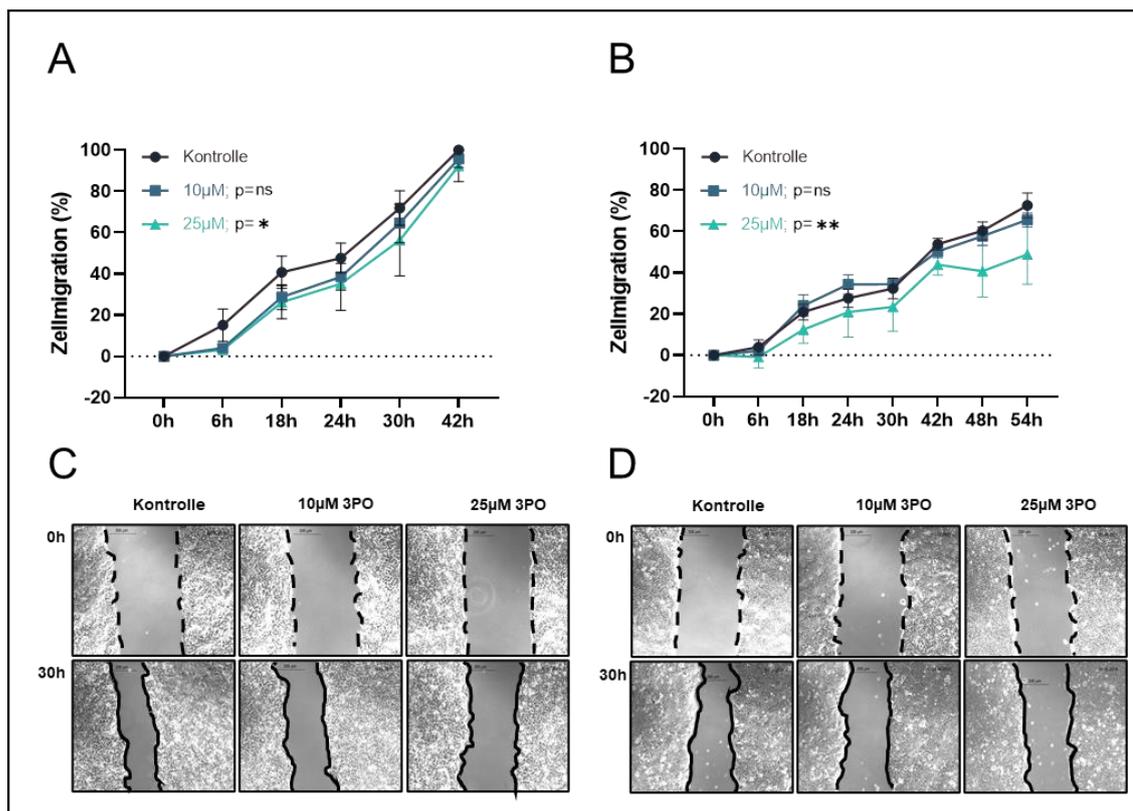


Abb. 15 (A – D) Effekt von 3PO auf die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen. Analyse des prozentualen Anteils der geschlossenen Spaltbreite nach Entfernung der Zellkultureinsätze im zeitlichen Verlauf von HCT-116 (A) und HT-29 (B) unter Therapie mit verschiedenen Konzentrationen von 3PO. Abbildungen eines repräsentativen Verlaufs vom Spaltverschluss durch Migration von HCT-116 (C) und HT-29 Zellen (D) abhängig von unterschiedlichen Konzentrationen von 3PO. Dargestellt ist die Spaltbreite direkt nach dem Entfernen der Zellkultureinsätze zum Zeitpunkt 0 h durch eine gestrichelte schwarze Linie. Die migrierten Zellfronten wurden nach 30 h für HCT-116 (C) und HT-29 (D) durch eine durchgezogene Linie dargestellt.

3.1.8 Auswirkung der Kombinationstherapie von 3PO und Bestrahlung auf die Migration von HCT-116 und HT-29 *in vitro*

Das Migrationsverhalten von KRK-Zelllinien während einer Behandlung mit 3PO in Kombination mit Bestrahlung wurde mit einem Wundheilungs-Assay überprüft. Die Bestrahlung wurde 4 h nach der Zugabe von 3PO mit einer Einzeldosis von 6 Gy durchgeführt. HCT-116 Zellen und HT-29 Zellen zeigten ein signifikant verringertes Migrationspotential in einer zeitlichen Konzentrations-Wirkungs-Abhängigkeit (Abb. 16 A – B). HCT-116 Zellen zeigten unter Verwendung von 10 μM und 25 μM 3PO eine signifikante Abnahme der Migration gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle. Die alleinige RT führte zu keiner Veränderung des Migrationsverhaltens von HCT-116 (Abb. 16 A). Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Zunahme der Migration von HT-29 Zellen, die mittels alleiniger RT behandelt wurden, gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle gemessen. Weiterhin zeigten HT-29 Zellen eine

signifikante Reduktion der Migration bei 25 μM 3PO (Abb. 16 B). Die Fähigkeit zur Migration der Tumorzelllinien wird durch die Größe der zellfreien Fläche zwischen den Zellfronten verdeutlicht. Im Verlauf des Versuchs wurde die Fläche zwischen den Zellfronten durch migrierende Zellen bedeckt. Die repräsentativen Aufnahmen von HCT-116 und HT-29 Zellen nach 30 h ergaben einen erkennbaren Unterschied in der Größe des zellfreien Areal (Abb. 16 C – D). Dabei erschien die zellfreie Fläche zwischen den Zellfronten in der nicht bestrahlten Kontrollgruppe kleiner verglichen mit den 3PO-behandelten Gruppen zum gleichen Zeitpunkt. Dies verdeutlichte die verminderte Migrationsfähigkeit von HCT-116 Zellen und HT-29 Zellen unter der Kombinationsbehandlung von 3PO und Bestrahlung.

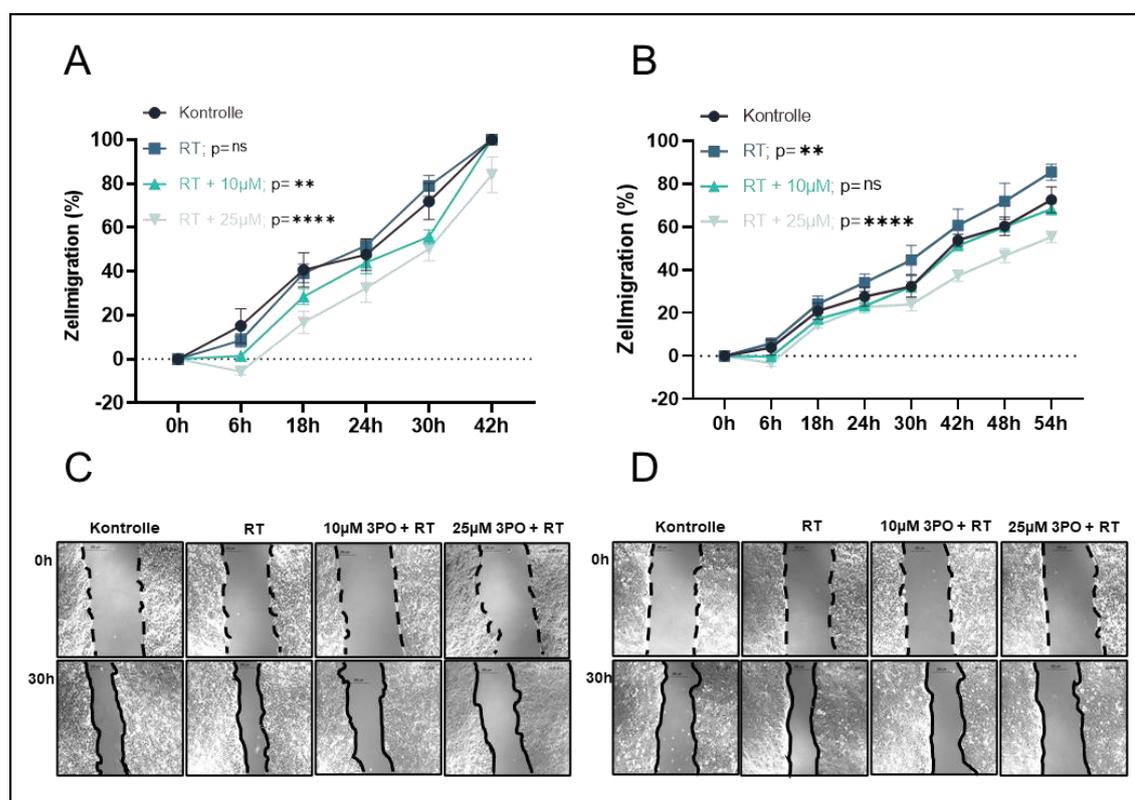


Abb. 16 (A – D) Effekt einer Kombinationstherapie von 3PO und Radiotherapie auf die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen. Analyse des prozentualen Anteils der geschlossenen Spaltbreite nach Entfernung der Zellkultureinsätze im zeitlichen Verlauf von HCT-116 (A) und HT-29 (B). Abbildungen eines repräsentativen Verlaufs vom Spaltverschluss durch Migration von HCT-116 (C) und HT-29 Zellen (D) abhängig von unterschiedlichen Konzentrationen von 3PO in Kombination mit Radiotherapie an verschiedenen Zeitpunkten. Dargestellt ist die Spaltbreite direkt nach dem Entfernen der Zellkultureinsätze zum Zeitpunkt 0 h durch eine gestrichelte schwarze Linie. Die migrierten Zellfronten wurden nach 30 h für HCT-116 (C) und HT-29 (D) durch eine durchgezogene Linie dargestellt.

3.1.9 Einfluss von 3PO auf die Invasivität von HCT-116 und HT-29 *in vitro*

Eine wichtige Grundlage für die Metastasierung von Tumorzellen bildet die Invasion. Dazu müssen Krebszellen in der Lage sein, die Basalmembran zu überwinden. Mittels proteolytischer Enzyme werden Bestandteile der Basalmembran degradiert und die Zellen können in die extrazelluläre Matrix eindringen. Anhand einer Boyden-Kammer (siehe Kap. 2.2.2.6) wurde die Auswirkung einer PFKFB3-Blockade durch 3PO auf die Invasivität der Tumorzelllinien des KRK untersucht. Mit steigender Konzentration von 3PO ergab sich eine signifikante Abnahme invasiver Zellen von HCT-116 und HT-29 konzentrationsabhängig (Abb. 17 A – B). Die relative Invasivität sank für HCT-116 Zellen bei 10 μM 3PO auf 84 % und bei 100 μM auf 42 % ab (Abb. 17 A). HT-29 Zellen zeigten eine Reduktion der relativen Invasivität auf 63 % bei 10 μM 3PO und 32 % bei 100 μM 3PO (Abb. 17 B).

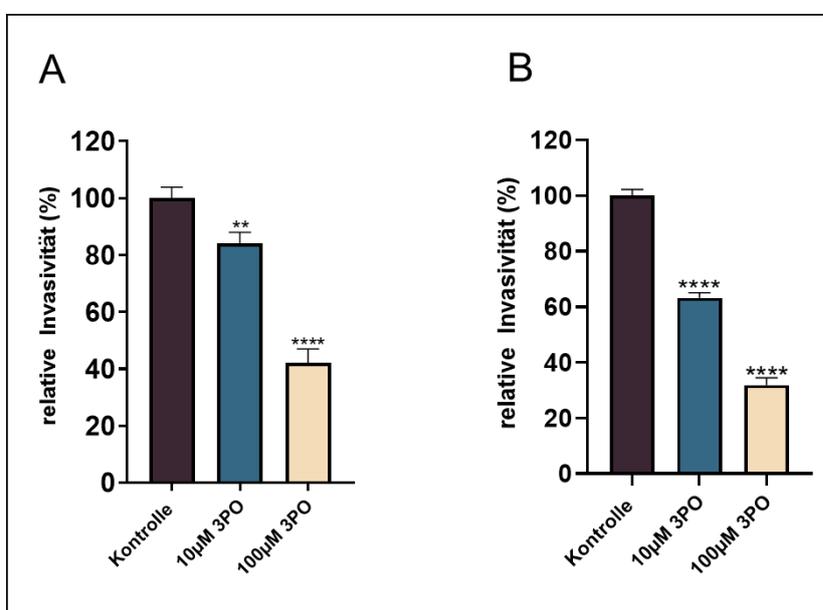


Abb. 17 (A – B) Effekt von 3PO auf die Tumorzellinvasivität. Abgebildet ist die relative Invasivität von HCT-116 (A) und HT-29 (B) Zellen behandelt mit verschiedenen Konzentrationen von 3PO über eine Dauer von 96 h. Die Invasivität der behandelten Zellen wird relativ zur Kontrollgruppe in Prozent angegeben.

3.1.10 Auswirkung der Kombinationstherapie von 3PO und Bestrahlung auf die Invasivität von HCT-116 und HT-29 *in vitro*

Die Wirkung einer PFKFB3-Blockade in Kombination mit Bestrahlung auf die Invasivität von Krebszellen, wurde mit einem weiteren Invasions-Assay untersucht. Die Bestrahlung wurde 4 h nach der Zugabe von 3PO mit einer Einzeldosis von 6 Gy durchgeführt. Mit steigender Konzentration von 3PO in Kombination mit Bestrahlung ergab sich eine signifikante Abnahme invasiver Zellen von HCT-116 und HT-29 konzentrationsabhängig gegenüber der Kontrolle (Abb. 18 A – B). Die relative Invasivität sank für HCT-116 Zellen bei

10 μM 3PO auf 63 % und bei 100 μM auf 28 % ab (Abb. 18 A). HT-29 Zellen zeigten eine Reduktion der relativen Invasivität auf 48 % bei 10 μM 3PO und auf 20 % bei 100 μM 3PO (Abb. 18 B). Die alleinige Bestrahlung von HCT-116 und HT-29 Zellen führte zu keiner Veränderung der Invasivität.

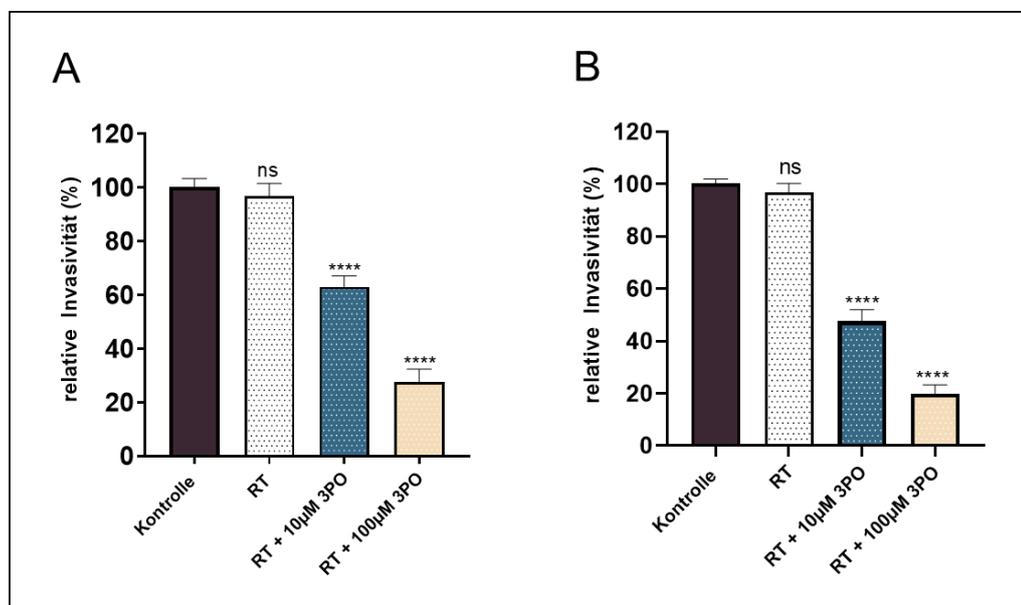


Abb. 18 (A – B) Effekt einer Kombinationstherapie von 3PO und Radiotherapie auf die Invasivität von Tumorzellen. Abgebildet ist die relative Invasivität von HCT-116 (A) und HT-29 (B) Zellen. Die Krebszellen wurden in einer Boyden-Kammer plattiert und mit verschiedenen Konzentrationen von 3PO für einen Zeitraum von 96 h inkubiert. Die Bestrahlung der Zellen mit einer Dosis von 6 Gy wurde 4 h nach der Zugabe von 3PO durchgeführt. Die Invasivität der behandelten Zellen wird relativ zur Kontrollgruppe in Prozent angegeben.

3.2 Etablierung von PDX-Modellen des KRK *in vivo*

Tumorproben des Rektumkarzinoms HROC239 und des kolorektalen Karzinoms Gö Pt. 23 wurden in PrkdcScid-Mäuse s. c. transplantiert. Vom Beginn der erstmaligen Tumorimplantation bis zum Therapiestart der Kohorten vergingen 132 Tage für HROC239 und 92 Tage für Gö Pt. 23. In dieser Zeit durchliefen die Tumoren zwei Generationen von Mäusen. Von der Transplantation der Tumoren in die Behandlungsgruppen bis zum Start der Therapieversuche vergingen für HROC239 35 Tage und für Gö Pt. 23 11 Tage. Die Behandlung der PDX-Mausmodelle wurde ab einem durchschnittlichen Tumolvolumen von 150 – 200 mm² gestartet. Zu diesem Zeitpunkt waren die s. c. gelegenen Tumoren makroskopisch sichtbar. Die Tumoren der unterschiedlichen Passagen zeigten ein exponentiell verlaufendes Wachstumsverhalten. Mikroskopisch behielten die Tumoren innerhalb der verschiedenen Passagen das histologische Erscheinungsbild eines Adenokarzinoms bei (Abb. 19).

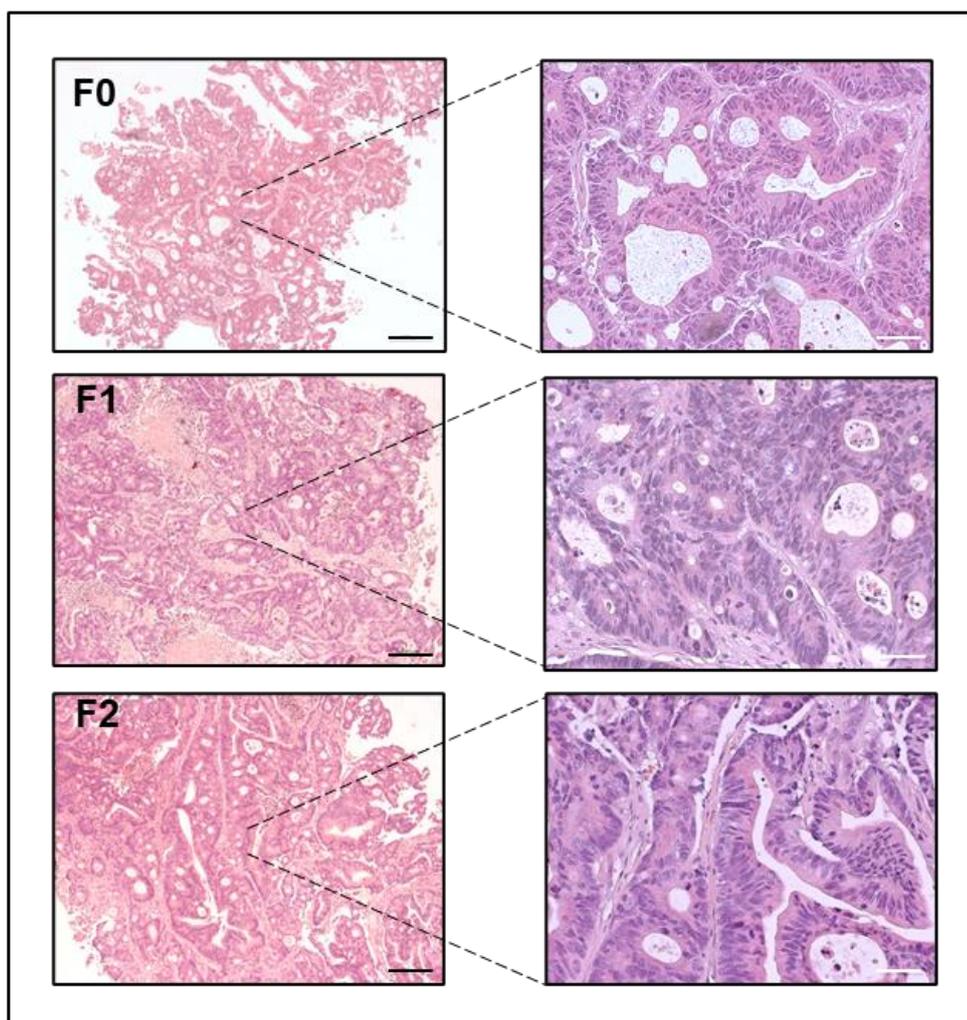


Abb. 19 Histologisches Wachstumsmuster des PDX-Modells HROC239 – Rektumkarzinom. Abgebildet sind die histologischen Gewebeschnitte des PDX-Modells HROC239 der Passagen F0, F1 und F2 in HE-Färbung. Schwarzer Maßstabsbalken: 200 µm. Weißer Maßstabsbalken: 50 µm.

3.3 Therapie humaner KRK mit einer Kombination aus 3PO und Bestrahlung

Der Effekt einer dualen Therapie von PDX-Tumoren des KRK wurde mittels 3PO in Kombination mit RT untersucht. Die Behandlung wurde, wie in der Abb. 6 (siehe Kap. 2.2.3.6) dargestellt, durchgeführt. Zu Beginn der Therapie erfolgten die i. p. Injektionen von 25 mg/kg 3PO zur Induktion der TVN. Die Bestrahlung wurde mit 14 Dosen à 1,8 Gy Einzeldosis appliziert. Dies entsprach der gleichen Einzeldosis, die Patient*innen zur neoadjuvanten Behandlung bei fortgeschrittenem lokalem Rektumkarzinom erhalten. Nach Therapieende wurden die Tumoren explantiert und histologische sowie immunohistochemische Färbungen angefertigt und analysiert.

3.3.1 Untersuchung der Tumovaskularisierung nach einer Kombinationstherapie mit 3PO und Bestrahlung

Als ein Regulator der Glykolyse steuert PFKFB3 die Proliferation und Migration von TEZ und nimmt Einfluss auf die Angiogenese. Um die Auswirkung einer PFKFB3-Blockade durch 3PO in Kombination mit Bestrahlung auf die Tumovaskularisierung zu analysieren, wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung von *Cluster of Differentiation 31* (CD31) die Expression von Endothelzellen im Tumorgewebe dargestellt (Abb. 20 D – G). Eine signifikante Abnahme der Fläche von CD31-positivem Endothel wurde bei der Behandlung mit alleiniger RT beobachtet. Wohingegen die Therapie mit 3PO und RT+3PO das Areal der CD31-positiven Fläche nicht signifikant gegenüber der Kontrollkohorte veränderte (Abb. 20 A). Zur weiteren Analyse wurde die Gefäßanzahl bestimmt. Diese ergab eine signifikante Abnahme unter RT und unter der Kombinationsbehandlung aus RT+3PO. Die alleinige PFKFB3-Blockade durch 3PO erbrachte keine signifikanten Veränderungen in der Gefäßanzahl (Abb. 20 B). Untersuchungen zur Lumengröße der Gefäße zeigten eine signifikante Zunahme nach der Behandlung mit 3PO, RT und RT+3PO. Bei zusätzlicher Gabe von 3PO zur RT wurde eine signifikante Zunahme der Fläche der Gefäßlumen gegenüber der alleinigen RT festgestellt (Abb. 20 C).

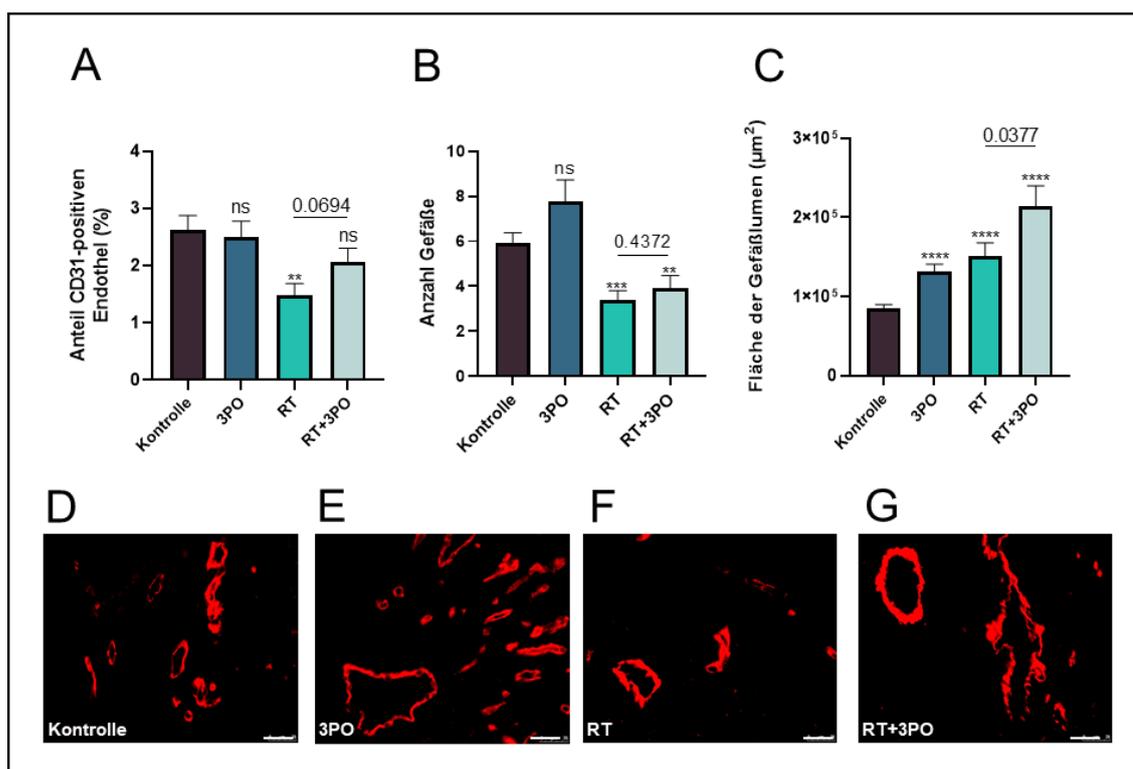


Abb. 20 (A – G) Analysen zur Tumolvaskularisierung von HROC239. Analyse des prozentualen Anteils an CD31-positivem Endothel (%) bezogen auf die gesamte Fläche (A). Anzahl der Gefäße pro Bildausschnitt (B). Fläche der Lumen in μm^2 der Gefäße (C). Abgebildet sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von rot gefärbten CD31-positiven Endothelflächen des Tumorgewebes der Kontrolle (D), 3PO (E), RT (F) und RT+3PO (G). Weißer Maßstabsbalken: 25 μm .

3.3.2 Analyse der Tumorphoxie nach Behandlung mit 3PO und Bestrahlung

Die Tumorphoxie wurde als Indikator für die Oxygenierung des Tumorgewebes gemessen. Um die Auswirkung einer Kombinationstherapie aus RT und 3PO auf die Tumorphoxie zu untersuchen, wurden die hypoxischen Areale im Tumorgewebe mittels immunhistochemischer Färbung durch Pimonidazol dargestellt (Abb. 21 A – E). Nach alleiniger Behandlung mit RT wurden keine signifikanten Veränderungen in der hypoxischen Fläche nachgewiesen. Die Therapie mit 3PO reduzierte signifikant die gemessenen hypoxischen Areale im Tumorgewebe. Die Kombinationstherapie aus RT+3PO ergab keine signifikante Abnahme der hypoxischen Areale im Vergleich zur Kontrolle. Gegenüber der alleinigen Bestrahlung wurde jedoch eine signifikante Abnahme der hypoxischen Fläche im Tumorgewebe festgestellt.

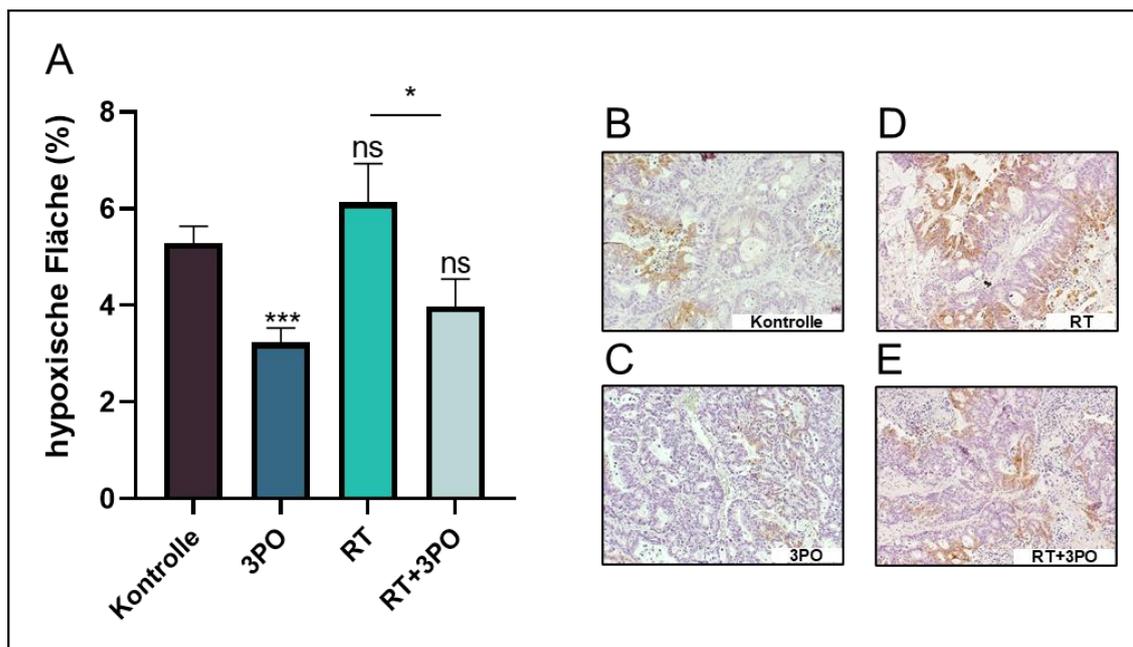


Abb. 21 (A – E) Analyse der Hypoxie im Tumorgewebe des KRC HROC239. Analyse des relativen Anteils der hypoxischen Areale (%) in Bezug zur gesamten Tumorfläche (A). Repräsentative Aufnahmen der Pimonidazol-Färbung des Tumorgewebes der Kontrolle (B), 3PO (C), RT (D) und RT+3PO (E). Hypoxisches Tumorgewebe wird durch Pimonidazol braun gefärbt.

3.3.3 Wachstum der PDX-Modelle während einer Behandlung mit 3PO und Bestrahlung

Anhand von 18 PDX-Mäusen des Rektumkarzinoms HROC239 wurde die *In-vivo*-Wirkung einer PFKFB3-Blockade durch 3PO in Kombination mit RT auf das Wachstum s. c. gelegener Tumoren analysiert (Tbl. 14 und Abb. 22).

Tbl. 14 Daten von HROC239 während Therapie mit 3PO in Kombination mit Bestrahlung

HROC239	Anzahl Mäuse	Körpergewichtsveränderungen (%)	<i>treatment to control</i> (t/c)-Wert (%) am Endpunkt des Tierversuchs
Kontrolle	5	+ 0,2	100
3PO	4	+ 1,4	91
RT	4	+ 0,8	15
RT+3PO	5	- 1,6	17

Ab einer Tumorgröße von 150 – 200 mm² wurden die Versuchstiere randomisiert und anhand des Tumolvolumens gleichmäßig den verschiedenen Therapiearmen (Kontrolle, 3PO, RT und RT+3PO) zugeordnet. Um den Tumorblutgefäß normalisierenden Effekt von 3PO zu induzieren, wurden die Mäuse vor Beginn der Bestrahlung mit fünf Gaben 3PO vorbehandelt. Mit der sechsten Gabe von 3PO wurde erstmals die Bestrahlung mit 1,8 Gy

Einzel-dosis durchgeführt. Erste signifikante Unterschiede im Tumorwachstum wurden 16 Tage nach Therapiebeginn zwischen der Kontrollkohorte gegenüber der RT- (t/c: 27 %, $p < 0,05$) und RT+3PO-Kohorte (t/c: 28 %, $p < 0,05$) gemessen. Im weiteren Verlauf der Behandlung wurden die Mäuse der Kontrollgruppe nach 55 Tagen getötet. Eine Woche später wurden die Versuchstiere der 3PO-Kohorte getötet. Die Versuchstiere der RT- und RT+3PO-Kohorte wurden bis insgesamt 90 Tage nach der Tumorimplantation weiter beobachtet, um die langfristigen Auswirkungen auf das Auftreten von Wachstumsrezidiven zu beobachten. Während dieses Zeitraums wurde kein erneutes Wachstum der Tumoren festgestellt. Sowohl die mit RT behandelten Tumoren (t/c: 15 %, $p < 0,05$) als auch die mit einer Kombination aus 3PO und RT therapierten Versuchstiere (t/c: 17 %, $p < 0,05$) wiesen ein signifikant verringertes Tumorwachstum gegenüber der Kontrollgruppe auf.

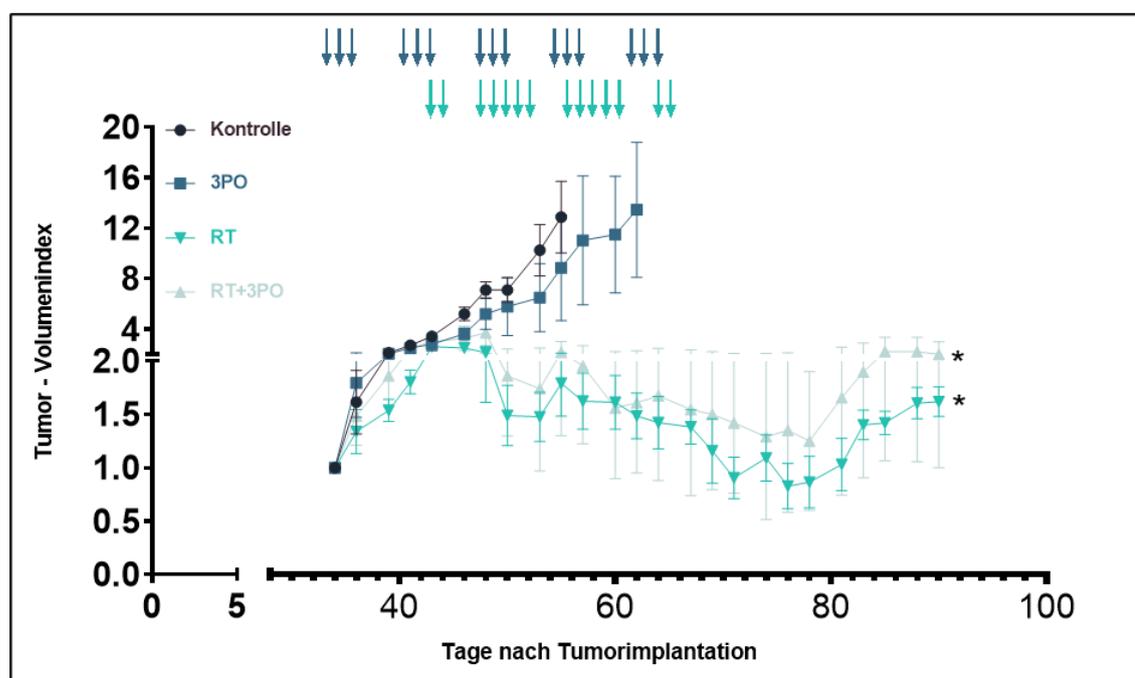


Abb. 22 Relative Wachstumskurve von HROC239 während der Behandlung mit 3PO (25 mg/kg) und RT (1,8 Gy) allein und in Kombination. Der Tumor-Volumenindex gibt die relative Größenzunahme der Tumoren im Verlauf der Therapie gegenüber dem Behandlungsstart an. Die zeitliche Gabe von 3PO (blau) und Durchführung der Bestrahlung (türkis) wird durch Pfeile verdeutlicht. Die Tumordaten sind als Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Nach der Tötung der Versuchstiere wurden die Tumoren explantiert und gewogen (Abb. 23). Ein signifikant verringertes Gewicht wiesen die Tumoren der RT- und RT+3PO-Kohorte gegenüber der Kontrollgruppe auf. Gewichtsunterschiede zwischen den explantierten Tumoren der Kontrollgruppe und der mit 3PO behandelten Kohorte wurden nicht ermittelt.

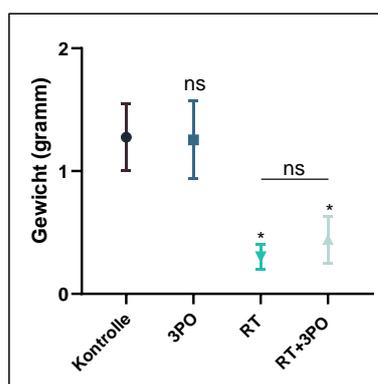


Abb. 23 Gewicht der Tumoren nach Abschluss der Behandlung. Abgebildet sind die mittleren Gewichte der Tumoren einer Behandlungsgruppe nach Abtötung der Versuchstiere. Das Gewicht wird in Gramm angegeben. Die Fehlerbalken werden als Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

3.3.4 Residuale Tumorphläche nach einer Behandlung mit 3PO und Bestrahlung

Im Anschluss an die Therapie der PDX-Tumoren wurde die residuale Tumorphläche anhand von histologischen Schnitten ermittelt (Abb. 24 A – E). Die residuale Tumorphläche nahm in der RT-Kohorte und der RT+3PO-Kohorte gegenüber der Kontrolle signifikant ab. Im Vergleich zwischen diesen beiden Kohorten zeigte die Behandlungskohorte mit zusätzlicher Gabe von 3PO eine signifikant verminderte residuale Tumorphläche. Die Verabreichung von 3PO allein veränderte die Fläche des Residualtumors nicht.

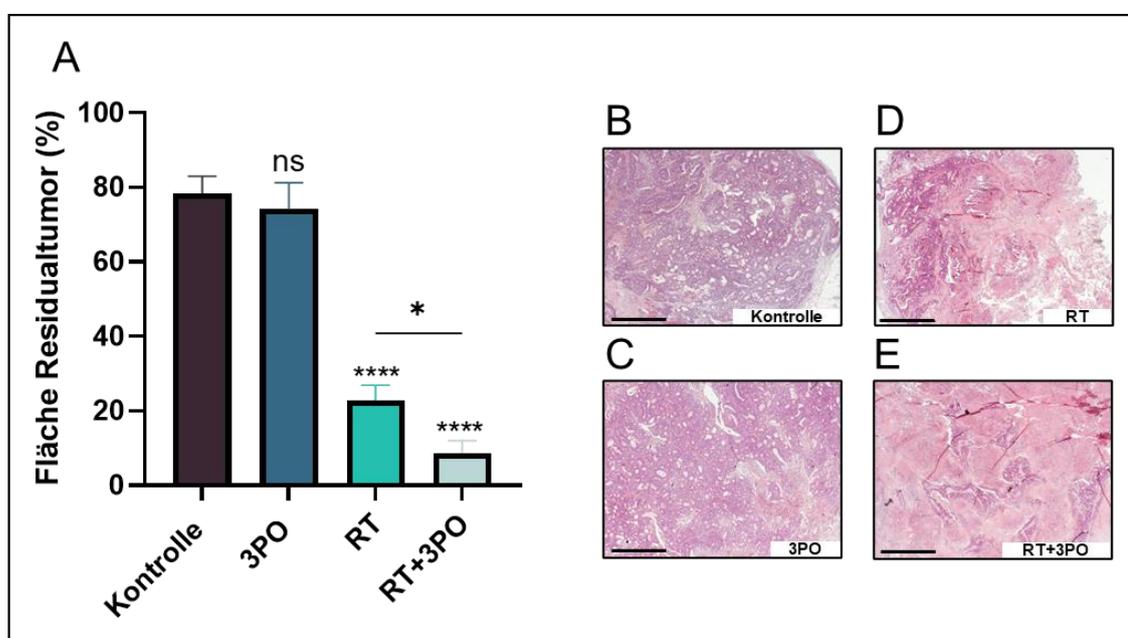


Abb. 24 (A – E) Analyse der residualen Tumorphläche des PDX-Modells HROC239. Analyse des relativen Anteils der Fläche des Residualtumors (%) in Bezug zur gesamten Fläche (A). Repräsentative Aufnahmen des Tumorgewebes in HE-Färbung der Kontrolle (B), 3PO (C), RT (D) und RT+3PO (E). Schwarzer Maßstabsbalken: 500 μ m.

3.3.5 BrdU-Proliferationsindex nach einer Behandlung mit 3PO und Bestrahlung

Um die Auswirkung einer Therapie aus 3PO in Kombination mit RT auf die Tumorzellproliferationsrate zu untersuchen, wurde der BrdU-Proliferationsindex im Tumorgewebe analysiert (Abb. 25 A – E). Eine signifikante Zunahme des Proliferationsindex wurde unter Behandlung mit RT sowie unter der Kombinationstherapie bestehend aus RT+3PO beobachtet. Im Vergleich zwischen den beiden bestrahlten Kohorten wies die Behandlungskohorte, die zusätzlich 3PO verabreicht bekam, eine signifikant verminderte Tumorzellproliferation auf. Die Therapie mit 3PO allein führte zu keiner signifikanten Veränderung.

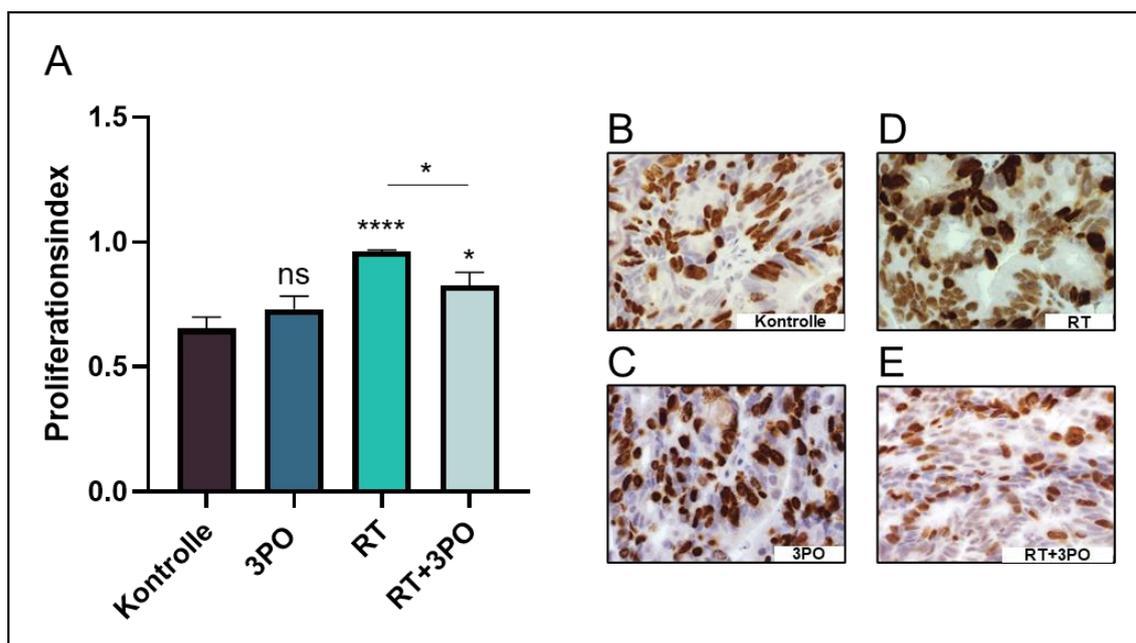


Abb. 25 (A – E) Analyse des BrdU-Proliferationsindex im Tumorgewebe des KKK HROC239. Analyse des Proliferationsindex als relativer Anteil BrdU-positiver Zellen zu allen Zellen (A). Repräsentative Aufnahmen des Tumorgewebes der Kontrolle (B), 3PO (C), RT (D) und 3PO+RT (E). Proliferierende Zellen werden durch BrdU braun gefärbt.

3.4 Therapie humaner KRK mit einer Kombination aus 3PO und Radiochemotherapie

Untersucht wurde der Effekt der Therapie von PDX-Tumoren des KRK mittels 3PO in Kombination mit einer RCT. Die Therapie wurde, wie in der Abb. 7 (siehe Kap. 2.2.3.6) dargestellt, durchgeführt. Zu Beginn der Therapie erfolgten die i. p. Injektionen von 25 mg/kg 3PO zur Induktion der TVN. Für die Bestrahlung wurden 14 Dosen à 1,8 Gy Einzeldosis appliziert. Die i. p. Injektion von 20 mg/kg 5FU erfolgte am 10. und 11. sowie am 22. und 23. Behandlungstag. Nach Therapieende wurden die Tumoren explantiert und histologische sowie immunhistochemische Färbungen angefertigt und analysiert.

3.4.1 Untersuchung der Tumolvaskularisierung nach einer Kombinationstherapie aus 3PO und RCT

Als ein Regulator der Glykolyse steuert PFKFB3 die Proliferation und Migration von TEZ und nimmt Einfluss auf die Angiogenese. Um die Auswirkung einer PFKFB3-Blockade durch 3PO in Kombination mit einer RCT auf die Tumolvaskularisierung zu analysieren, wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung von CD31 die Expression von Endothelzellen im Tumorgewebe dargestellt (Abb. 26 D - H). Eine signifikante Abnahme der Fläche von CD31-positivem Endothel wurde bei der Behandlung mit 5FU, 5FU+RT und 5FU+RT+3PO beobachtet. Wohingegen die alleinige Therapie mit 3PO das Areal der CD31-positiven Fläche nicht veränderte (Abb. 26 A). Die Gefäßanzahl nahm unter Therapie mit 5FU, 5FU+RT und 5FU+RT+3PO signifikant ab (Abb. 26 B). Untersuchungen der Gefäßlumengröße ergaben eine signifikante Zunahme nach Therapie mit 3PO und 5FU+RT+3PO im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit 5FU und 5FU+RT führte zu keinen Veränderungen der Fläche der Gefäßlumen (Abb. 26 C).

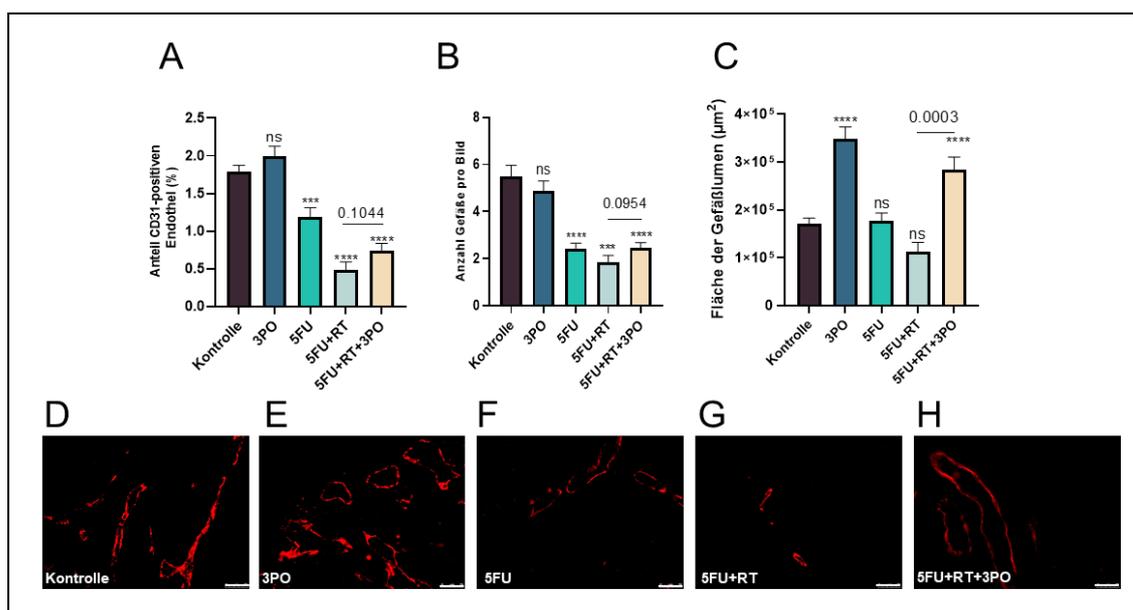


Abb. 26 Analysen zur Tumorvaskularisierung von Gö Pt. 23. Analyse des prozentualen Anteils an CD31-positivem Endothel (%) bezogen auf die gesamte Fläche (A). Anzahl der Gefäße pro Bildausschnitt (B). Fläche der Lumen in μm^2 der Gefäße (C). Abgebildet sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von rot gefärbten CD31-positiven Endothelflächen des Tumorgewebes der Kontrolle (D), 3PO (E), 5FU (F), 5FU+RT (G) und 5FU+RT+3PO (H). Weißer Maßstabsbalken: 25 μm .

3.4.2 Analyse der Tumorhypoxie nach einer Behandlung mit 3PO und RCT

Die Tumorhypoxie wurde als Indikator für die Oxygenierung des Tumorgewebes gemessen. Um die Auswirkung einer RCT in Kombination mit 3PO auf die Tumorhypoxie zu untersuchen, wurden die hypoxischen Areale im Tumorgewebe mittels immunhistochemischer Färbung durch Pimonidazol dargestellt (Abb. 27 A – F). Unter Therapie mit 5FU und der Kombinationsbehandlung aus 5FU+RT wurden keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen. Die Therapie mit 3PO reduzierte signifikant die gemessene hypoxische Fläche im Tumorgewebe. Auch die Kombinationstherapie aus 5FU+RT+3PO ergab eine signifikante Abnahme der hypoxischen Areale im Vergleich zur Kontrolle sowie zur Kombinationsbehandlung bestehend aus 5FU+RT.

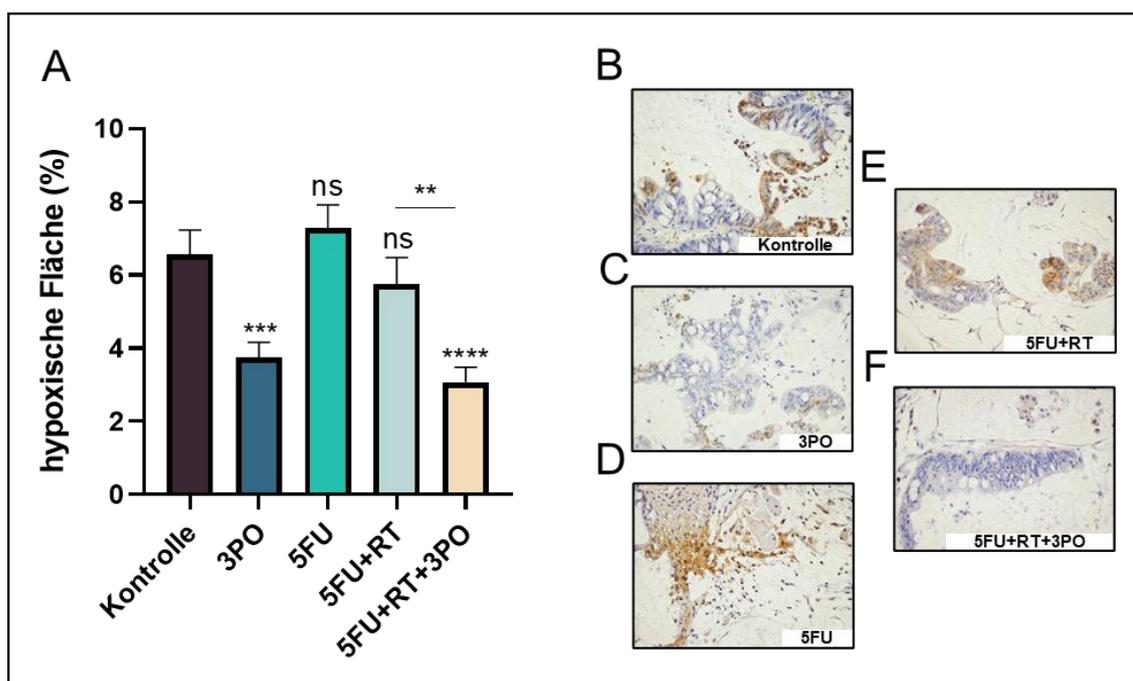


Abb. 27 Analyse der Hypoxie im Tumorgewebe des KRK Gö Pt. 23. Analyse des relativen Anteils der hypoxischen Areale (%) in Bezug zur gesamten Tumorfläche (A). Repräsentative Aufnahmen des Tumorgewebes der Kontrolle (B), 3PO (C), 5FU (D), 5FU+RT (E) und 5FU+RT+3PO (F). Hypoxisches Tumorgewebe wird durch Pimonidazol braun gefärbt.

3.4.3 Wachstum der PDX-Modelle während einer Behandlung mit 3PO und RCT

Anhand von 31 PDX-Mäusen des KRK Gö Pt. 23 wurde, die *In-vivo*-Wirkung einer PFKFB3-Blockade durch 3PO in Kombination mit RCT auf das Wachstum s. c. gelegener Tumoren analysiert (Tbl. 15 und Abb. 28).

Tbl. 15 Daten von Gö Pt. 23 während der Therapie mit 3PO in Kombination mit einer RCT

Gö. Pt. 23	Anzahl Mäuse	Körpergewichtsveränderungen (%)	treatment to control (t/c)-Wert (%) am Endpunkt des Tierversuchs
Kontrolle	6	+ 0,4	100
3PO	6	- 3,6	102
5FU	5	+ 0,6	87
5FU+RT	7	- 5,7	24
5FU+RT+3PO	7	- 6,1	23

Ab einer Tumorgroße von 150 – 200 mm² wurden die Versuchstiere randomisiert und anhand des Tumolvolumens gleichmäßig den verschiedenen Therapiearmen (Kontrolle, 3PO, 5FU, 5FU+RT und 5FU+RT+3PO) zugeordnet. Um den Tumorblutgefäß normalisierenden Effekt von 3PO zu induzieren, wurden die Mäuse vor Beginn der Bestrahlung mit fünf

Gaben 3PO vorbehandelt. Mit der sechsten Gabe von 3PO wurde erstmals die Bestrahlung mit 1,8 Gy durchgeführt. Erste anhaltende signifikante Unterschiede im Tumorwachstum wurden 12 Tage nach Therapiebeginn zwischen der Kontrollkohorte und der 5FU+RT+3PO-Kohorte (t/c: 53 %, $p < 0,05$) und nach 17 Tagen für die 5FU+RT-Kohorte (t/c: 47 %, $p < 0,05$) gemessen. Im weiteren Verlauf der Behandlung wurden die Versuchskohorten 42 Tage nach Tumorimplantation getötet. Sowohl die mit 5FU+RT behandelten Tumoren (t/c: 24 %, $p < 0,05$) als auch die mit einer Kombination aus 5FU+RT+3PO therapierten Versuchstiere (t/c: 23 %, $p < 0,05$) zeigten ein signifikant verringertes Tumorwachstum gegenüber der Kontrollgruppe auf. Die Tierkohorten, die allein mit 3PO (t/c: 102 %) und 5FU (t/c: 87 %) behandelt wurden wiesen keine signifikante Abnahme des Tumorwachstums auf.

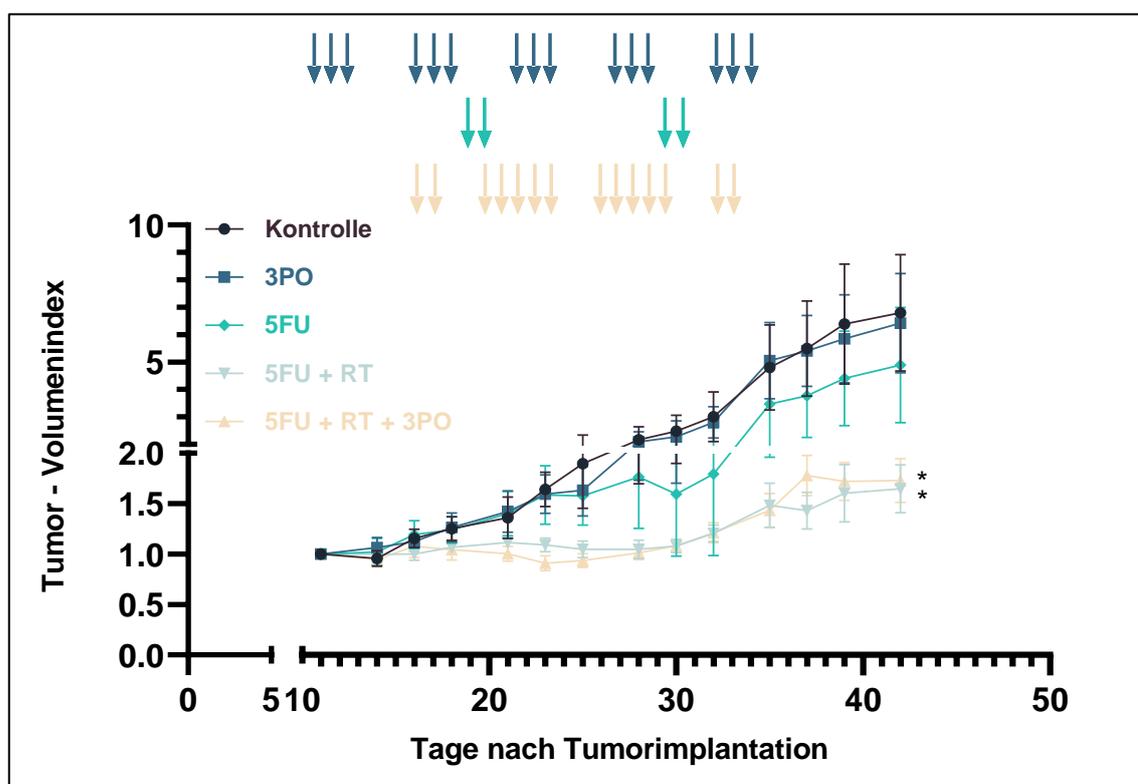


Abb. 28 Relative Wachstumskurve von Gö Pt. 23 während der Behandlung mit 3PO (25 mg/kg), 5FU (20 mg/kg) und RT (1,8 Gy) allein und in Kombination. Der Tumor-Volumenindex gibt die relative Größenzunahme der Tumoren im Verlauf der Therapie gegenüber dem Behandlungsstart an. Die zeitliche Gabe von 3PO (blau), 5FU (türkis) und die Durchführung der Bestrahlung (gelb) wird durch Pfeile verdeutlicht. Die Fehlerbalken der Tumorzahlen sind als Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

Nach der Tötung der Versuchstiere wurden die Tumoren explantiert und gewogen (Abb. 29 A). Ein signifikant verringertes Gewicht wiesen die Tumoren der 5FU+RT- und 5FU+RT+3PO-Kohorte gegenüber der Kontrollgruppe auf. Signifikante Unterschiede

zwischen der Kontrollgruppe und den mit 3PO sowie 5FU allein behandelten Versuchstieren wurden nicht gemessen. Makroskopisch (Abb. 29 B – F) zeigte sich eine Abnahme der Größe der Tumoren der 5FU+RT-Kohorte und 5FU+ RT+3PO-Kohorte nach Explantation.

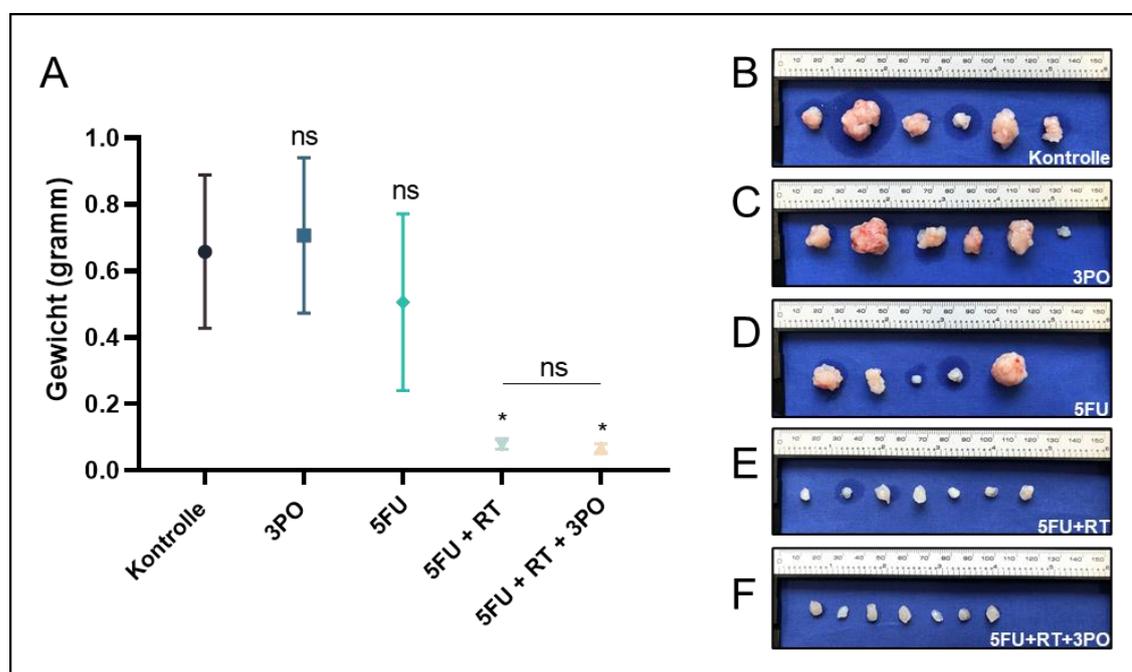


Abb. 29 Gewicht der Tumoren von Gö Pt. 23 nach Abschluss der Behandlung. Abgebildet sind die mittleren Gewichte der Tumoren einer Behandlungsgruppe nach Abtötung der Versuchstiere (A). Das Gewicht wird in Gramm angegeben. Die Fehlerbalken werden als Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Makroskopisch sind die Tumoren direkt nach der Explantation für die Kontrolle (B), 3PO (C), 5FU (D), 5FU+RT (E) und 5FU+RT+3PO (F) dargestellt.

3.4.4 Residuale Tumorfläche nach einer Behandlung mit 3PO und RCT

Im Anschluss an die Behandlung wurde die residuale Tumorfläche anhand von histologischen Schnitten ermittelt (Abb. 30 A – F). Eine signifikante Abnahme der residualen Tumorfläche zeigte sich in der 5FU+RT-Kohorte und der 5FU+RT+3PO-Kohorte gegenüber der Kontrolle. Im Vergleich zwischen diesen beiden Kohorten wurde keine verminderte residuale Tumorfläche gemessen. Die alleinige Gabe von 3PO und 5FU führte zu keiner Veränderung der Fläche des Residualtumors.

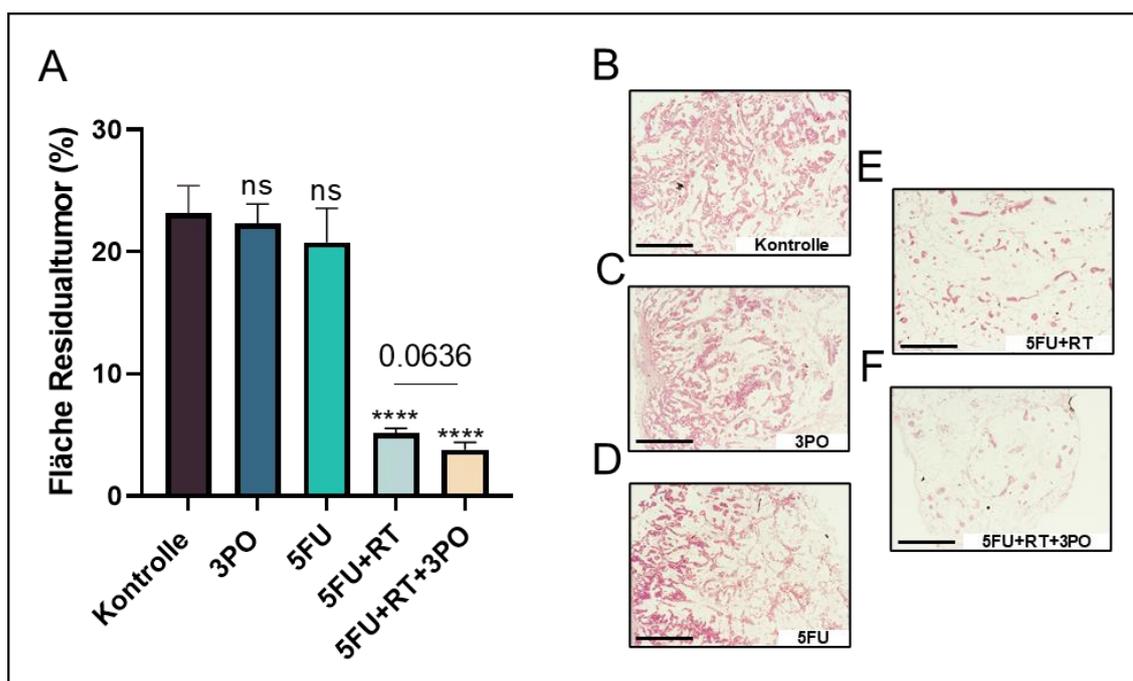


Abb. 30 Analyse der residualen Tumorfläche des KRK Gö Pt. 23. Analyse des relativen Anteils der Fläche des Residualtumors (%) in Bezug zur gesamten Fläche (A). Repräsentative Aufnahmen des Tumorgewebes in HE-Färbung der Kontrolle (B), 3PO (C), 5FU (D), 5FU+RT (E) und 5FU+RT+3PO (F). Schwarzer Maßstabsbalken: 500 μ m.

3.4.5 BrdU-Proliferationsindex nach einer Behandlung mit 3PO und RCT

Um die Auswirkung einer RCT in Kombination mit 3PO auf die Tumorzellproliferationsrate zu untersuchen, wurde der BrdU-Proliferationsindex im Tumorgewebe analysiert (Abb. 31 A – F). Eine signifikante Zunahme des Proliferationsindex wurde nach Behandlung mit 5FU+RT sowie nach der Kombinationstherapie zusammengesetzt aus 5FU+RT+3PO beobachtet. Die alleinige Therapie mit 3PO und 5FU ergab keine signifikanten Veränderungen. Im Vergleich zwischen beiden Kohorten, bei denen eine RCT durchgeführt wurde, führte die zusätzliche Applikation von 3PO zu keiner Veränderung des Proliferationsindex.

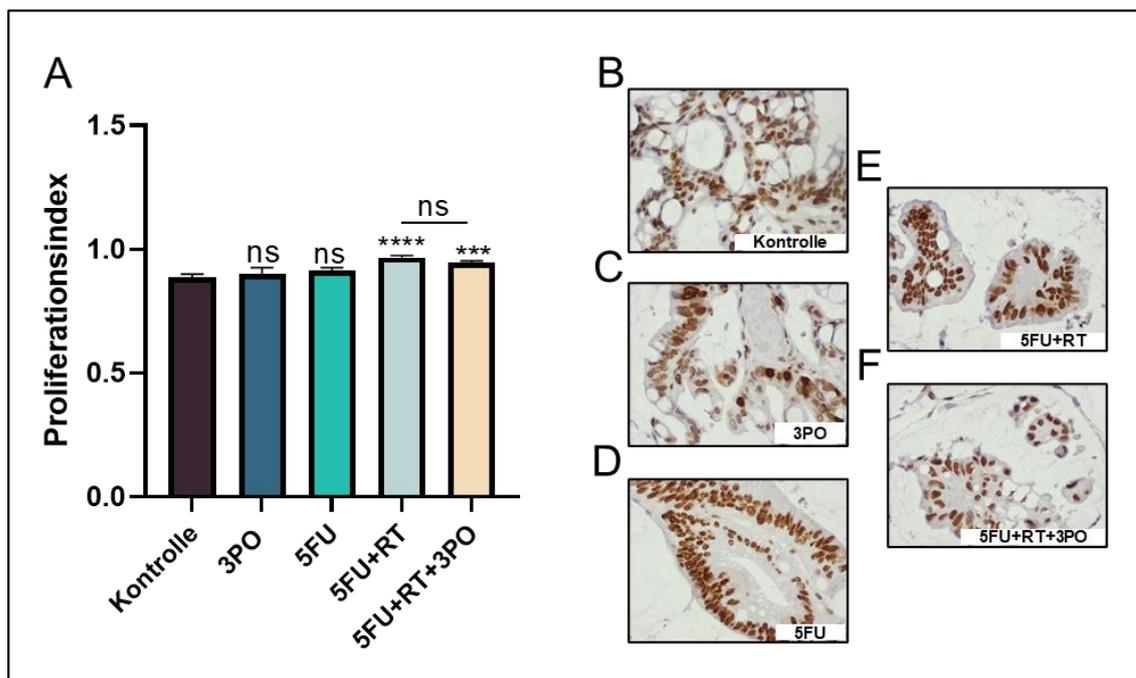


Abb. 31 Analyse des BrdU-Proliferationsindex im Tumorgewebe des KRK Gö Pt. 23. Analyse des Proliferationsindex als relativer Anteil BrdU-positiver Zellen zu allen Zellen (A). Repräsentative Aufnahmen des Tumorgewebes der Kontrolle (B), 3PO (C), 5FU (D), 5FU+RT (E) und 5FU+RT+3PO (F). Proliferierende Zellen werden durch BrdU braun gefärbt.

4 Diskussion

Diese Arbeit untersucht die Auswirkungen einer PFKFB3-Blockade durch 3PO an verschiedenen Zelllinien des KRK und in HUVEC. Des Weiteren wurden Versuche mit einer Kombinationstherapie bestehend aus 3PO und RT an Zelllinien des KRK durchgeführt. In der aktuellen Literatur sind bislang noch keine Veröffentlichungen verfügbar, welche die Wirkung von 3PO in Kombination mit ionisierender Strahlung auf Zellen des KRK untersucht haben. Im Anschluss an die *In-vitro*-Versuche wurden PDX-Mausmodelle des KRK etabliert und mit einer Kombination aus 3PO und RT bzw. RCT behandelt. Erkenntnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Verwendung von 3PO in Kombination mit bisheriger Standard-RCT einen vielversprechenden Ansatz für die Behandlung von Patient*innen mit KRK darstellen könnte.

4.1 3PO beeinflusst konzentrationsabhängig die Zellproliferation, Zellviabilität, Migrationsfähigkeit und Invasivität von kolorektalen Krebszellen

Die pharmakologische Blockade von PFKFB3 mittels 3PO stellt eine interessante antineoplastische Strategie dar, weil besonders hochproliferative Tumorzellen Glukose verstoffwechseln und sensibel auf Glukosedepriuation reagieren (Clem et al. 2008). Im xCELLigence-Assay wurden morphologische Veränderungen und eine reduzierte Proliferation der Krebszellen (siehe Kap. 3.1.1) beobachtet. Dieses Ergebnis bestätigt bisherige Untersuchungen, die einen Einfluss von 3PO auf die Zellproliferation von transformierten Zellen zeigten (Clem et al. 2008). Eine genaue Differenzierung des Verhaltens der Zellen im xCELLigence ist nicht möglich, da Veränderungen im Zellindex durch verschiedene Parameter beeinflusst werden können. Änderungen des Adhärenzverhaltens und der Proliferationsstärke nehmen Einfluss auf den Zellindex. Krebszellen verlieren während der Behandlung mit zytotoxischen Substanzen ihre natürliche Morphologie und Adhärenzfähigkeit, wodurch der Zellindex abnimmt. Demgegenüber können zytotoxische Substanzen ebenfalls zu einer Abplattung der Zellen führen. In Folge einer vergrößerten Ausdehnung kann sich der Zellindex erhöhen (Xing et al. 2006). Daher wurden zur näheren Charakterisierung der Wirkung von 3PO auf HCT-116 Zellen, HT-29 Zellen und HUVEC weitere Analysen zur Zellproliferation, zum Zelltod sowie zur Migrations- und Invasionsfähigkeit durchgeführt. Die Analysen zur Zellproliferation im CTB-Assay und zum Zelltod im LDH-Assay ergaben bei allen verwendeten Zelllinien einen konzentrationsabhängigen Effekt. Mit steigender Konzentration von 3PO nahm die Zellproliferation ab. Dem entgegengesetzt stieg die LDH-Freisetzung an. Die

zytotoxische Wirkung von 3PO wurde bereits an Zelllinien der akuten T-Zell Leukämie (Jurkat Zellen), der chronisch myeloischen Leukämie (K562), der akuten Promyelozyten Leukämie (HL-60), eines Zervixkarzinoms (HeLa), eines metastasierten Adenokarzinoms der Brust (MDA-MB231) und anhand von Melanomzellen (CRL-11174) nachgewiesen (Clem et al. 2008). Zuletzt wurde in Versuchen an A375 Melanomzellen und Krebszelllinien des Endometriumkarzinoms gezeigt, dass hohe Konzentrationen von 3PO zytotoxisch wirken. Die Caspase 3 vermittelte Induktion der Apoptose wurde als Hauptmechanismus der Einleitung des Zelltods bei Krebszelllinien der Brust, des Ovars, des Endometriums sowie bei Melanomzellen ermittelt (Xintaropoulou et al. 2015; Kotowski et al. 2020; Xiao et al. 2021). Bisherige Studien weisen darauf hin, dass die zytotoxische Wirkung bei einer PFKFB3-Blockade durch eine veränderte Expression von Cyclin-abhängigen Kinasen und eine Herunterregulation der ERCC1-Expression vermittelt wird. Die beobachtete Abnahme der Zellviabilität ist durch die Einleitung des Zellzyklusarrests sowie der Beeinträchtigung von DNA-Reparaturfunktionen zu erklären (Yalcin et al. 2009a; Shi et al. 2018).

Anhand früherer *In-vitro*-Studien wurde eine signifikante Abnahme der Zellviabilität von A375 Melanom Zellen nach 24 h Inkubation bei 50 μ M 3PO beschrieben (Kotowski et al. 2020). Dies stimmt mit den Ergebnissen des CTB- und LDH-Assays der HT-29 Krebszellen überein. Im Vergleich dazu zeigten HCT-116 Zellen bereits ab 25 μ M 3PO eine signifikante Abnahme der Zellviabilität und reagierten sensibler auf 3PO. In einer aktuellen Arbeit wurde gezeigt, dass 3PO in einer Konzentration von 40 μ M eine zytotoxische Wirkung auf HUVEC ausübt (Veseli et al. 2020). Dies ist konsistent mit den Ergebnissen des CTB- und LDH-Assays in dieser Arbeit. Signifikante zytotoxische Effekte erbrachten die Versuche an HUVEC ab einer Konzentration von 30 μ M bzw. 50 μ M 3PO.

Bei verschiedenen Tumorerkrankungen besteht eine Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben und einer erhöhten Metastasierungsrate bei gesteigerter PFKFB3-Expression (de Oliveira et al. 2021; Kotowski et al. 2021). Veränderungen im zellulären Stoffwechsel von Krebszellen sind für die Tumorentstehung und -progression in ungünstiger Umgebung unabdingbar. Als Beispiel hierfür gilt unter anderem eine verstärkte glykolytische Aktivität (Pavlova und Thompson 2016). Frühere Studien haben bereits verdeutlicht, dass die Blockade der Glykolyse in Krebszellen mit einem Rearrangement des Zytoskeletts einhergeht, wodurch die Tumorzellmigration sowie die Tumorzellinvasion beeinträchtigt wird (Sottnik et al. 2011; Du et al. 2015; Han et al. 2016). Eine signifikante Abnahme der Migration unter Therapie mit 3PO wurde bei beiden Krebszelllinien HCT-116 und HT-29 gemessen. Weiterführende Untersuchungen unter Einbeziehung von zellmigrationsbezogenen Genen

wären von Interesse. Bisherige Untersuchungen erbrachten, dass eine PFKFB3-Inhibition mit einer vermehrten Expression von vaskulär-endothelialen(VE)-Cadherin sowie einer Verminderung von Krebszelladhäsionsmolekülen (*vascular cell adhesion molecule-1*, *intercellular adhesion molecule-1* und *endothelial-selectin*) einhergeht (Cantelmo et al. 2016). Eine verringerte Expression von migrations- und invasionsrelevanten Genen (*PAXILLIN*, *VINCULIN*, *CORTACTIN* und *WISKOTT-ALDRICH-SYNDROM-FAKTOR1*) wurde nach Behandlung mit dem PFKFB3-Inhibitor KAN0438757 in HUVEC beschrieben, jedoch nicht bei Krebszelllinien (de Oliveira et al. 2021). Die Invasivität von HCT-116 und HT-29 Zellen wurde bei einer Konzentration von 100 μM 3PO signifikant reduziert. Basierend auf den Ergebnissen des CTB- und LDH-Assays kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Abnahme durch den zytotoxischen und antiproliferativen Effekt von 3PO in höheren Konzentrationen bedingt ist. Daher wurde ein weiterer Versuch mit einer geringen Konzentration von 10 μM 3PO durchgeführt. In dieser Konzentration ergab sich im CTB- und LDH-Assay keine signifikante Reduktion der Zellproliferation und Zellviabilität. Unter Verwendung von 10 μM 3PO konnte eine signifikante Abnahme der Invasivität der Tumorzellen beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass 3PO auch in einer nicht-zytotoxischen Konzentration hemmend auf die Invasionsfähigkeit von Krebszellen wirkt. Vergleichbare Studien ergaben, dass die Inhibition von PFKFB3 die Migrationsfähigkeit und Invasivität von CNE2 Zellen (Nasopharynxkarzinom) und CAL27 Zellen (Plattenepithelkarzinom der Zunge), über die Veränderung wichtiger Marker der Epithelial-mesenchymalen Transition, hemmt (Gu et al. 2017; Li et al. 2017). Die Inhibition von PFKFB3 stellt somit eine Möglichkeit dar, die Motilität von Krebszellen zu reduzieren und das Risiko der Metastasierung zu verringern.

4.2 3PO wirkt strahlensensibilisierend in kolorektalen Krebszellen

Die neoadjuvante Strahlen- oder Radiochemotherapie ist ein wichtiger Bestandteil der Behandlung von Patient*innen mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom. Das Ansprechen der Patient*innen auf die präoperative RCT ist heterogen und reicht von der Ausbildung von Resistenzen und Krankheitsprogression, trotz intensiver Behandlung, bis hin zur vollständigen Rückbildung des Tumors. Um die Entwicklung von Strahlentherapieresistenzen zu überwinden, ist es notwendig, die bisherigen Behandlungsansätze zu überprüfen und weiter zu verbessern. Für die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen ist eine gesteigerte Glykolyse essenziell. Eine verstärkte Glykolyse fördert gleichzeitig die Entwicklung von Strahlenresistenzen in Krebszellen, indem DNA-Reparaturmechanismen aktiviert und die

Anzahl von DNA-Schäden reduziert werden können (Bhatt et al. 2015). Als ein Regulator der Glykolyse nimmt PFKFB3 eine wichtige Rolle im Metabolismus von Krebszellen ein. Die Drosselung der Glykolyse mittels Inhibierung von PFKFB3 durch 3PO könnte in Kombination mit ionisierender Strahlung synergistische, antineoplastische Wirkung erzielen. Das Ansprechen von HCT-116 Zellen, HT-29 Zellen und SW-1463 Zellen auf ionisierende Strahlung wurde *in vitro* durch einen Koloniebildungstest überprüft. Dieser Test gilt als Goldstandard in der Strahlenbiologie zur Messung des Zellüberlebens (Pomp et al. 1996). Die Ergebnisse des Koloniebildungstests lassen bei allen drei Zelllinien auf eine synergistische Wirkung von 3PO in Kombination mit RT schließen. HCT-116 Zellen, HT-29 Zellen und SW-1463 Zellen zeigten bei verschiedenen Dosen ein unterschiedlich starkes Ansprechen auf die Therapie. Frühere Untersuchungen belegten, dass Zelllinien des KRK durch eine heterogene intrinsische Strahlensensibilität ausgezeichnet sind (Spitzner et al. 2010). Gekennzeichnet durch eine divergente Strahlensensibilität der verschiedenen Zelllinien spiegelt dieses Ergebnis die interindividuelle Heterogenität von Tumoren wider. Der stärkste Abfall der Überlebensfraktion, selbst bei niedrigen Strahlendosen, wurde bei HCT-116 Zellen ermittelt. Demgegenüber nahm die Überlebensfraktion von HT-29 und SW-1463 Zellen erst mit steigender Dosis der RT ab. Übereinstimmend mit Ergebnissen aus vorherigen Studien wiesen HCT-116 Zellen die höchste Strahlensensibilität unter den verwendeten Zelllinien auf (Spitzner et al. 2010). Die Arbeitsgruppe um N. Gustafsson untersuchte das klonogene Überleben von U2OS Zellen (Osteosarkom) während einer PFKFB3-Inhibition durch KAN0438757 in verschiedenen Konzentrationen bei 0 Gy, 2 Gy und 6 Gy. Die Ergebnisse ergaben eine dosisabhängige Radiosensibilisierung der Zellen mit einer signifikanten Abnahme der Überlebensfraktion. Den Studienerkenntnissen folgend, war der radiosensibilisierende Effekt auf die fehlende Rekrutierung von RAD51 zurückzuführen. Der Verlust der homologen Rekombination habe zur verstärkten Toxizität geführt (Gustafsson et al. 2018). Ergänzend zu den Ergebnissen des Koloniebildungstests wurden weitere Analysen zur Zellproliferation und zum Zelltod der Krebszellen während der Behandlung mit 3PO und Bestrahlung durchgeführt. Der CTB-Assay kann als eine einfache und vergleichbare Variante gegenüber dem Koloniebildungstest zum Komplementieren der Daten angewendet werden (Anoopkumar-Dukie et al. 2005). In den verwendeten Krebszelllinien HCT-116, HT-29 sowie HUVEC wurde eine Abnahme der Zellproliferation im CTB-Assay bei alleiniger RT ermittelt. Alle drei Zelllinien besaßen keine zunehmende LDH-Freisetzung durch die alleinige Bestrahlung mit 6 Gy im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe. Der fehlende Anstieg der LDH-Freisetzung nach 48 h deutet darauf hin, dass unter alleiniger RT zu diesem Zeitpunkt kein verstärkter Zelltod zu beobachten ist, sondern die Zellen in ihrer Proliferation gehemmt

werden. Im Einklang mit diesen Ergebnissen haben verschiedene Studien nachgewiesen, dass ionisierende Strahlung zwischen 2 bis 8 Gy in Zelllinien von soliden Tumoren innerhalb von 72 h nach der Bestrahlung primär zu einer Blockade der Proliferation und nicht zur Einleitung der Apoptose führte (Mirzayans et al. 2005; Murray und Mirzayans 2013; Mirzayans et al. 2017). Die Wirkung von 3PO in Kombination mit ionisierender Strahlung ergab einen 3PO-induzierten Rückgang der Zellproliferation im CTB-Assay für HCT-116 Zellen ab 25 μM und für HT-29 Zellen ab 50 μM . Dies entsprach der gleichen Konzentration, in der bereits ohne Bestrahlung eine signifikante Abnahme der Zellproliferation beobachtet wurde. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des CTB-Assays wurde im LDH-Assay bei der gleichen zytotoxischen Konzentrationen ein signifikanter Anstieg der LDH-Freisetzung festgestellt. Interessanterweise zeigten Zellüberlebensstudien von immortalisierten normalen Fibroblasten (BJ-hTERT) im Gegensatz zu BJ-RAS Zellen (hTERT-immortalisierte Fibroblasten, die mit SV40 und RAS transformiert wurden) nur eine geringe Beeinflussung des klonogenen Überlebens, wenn diese mit dem PFKFB3-Inhibitor KAN0438757 in Kombination mit RT behandelt wurden. Gustafsson et al. (2018) schlussfolgerten, dass Konzentrationen die auf Krebszellen strahlensensibilisierend wirken, eine gute Verträglichkeit bei normalen Zellen aufweisen. Dieses Ergebnis kann nicht auf 3PO übertragen werden. Die Versuche an HUVEC belegten, dass 3PO in Kombination mit RT Einfluss auf den Zelltod nimmt. Dem entsprechend wirkte 3PO nicht selektiv auf Krebszellen, sondern besaß konzentrationsabhängig auch Auswirkungen auf normale, nicht transformierte Zellen.

Verschiedene Überlegungen können die strahlensensibilisierende Wirkung von 3PO *in vitro* erklären. Einerseits könnte 3PO die Glykolyse-induzierte Strahlenresistenz beeinflussen. Als ein *Hallmark of Cancer* sind Krebszellen durch einen veränderten Glukose-Metabolismus charakterisiert. Tumorzellen sind dadurch in der Lage mittels Akkumulation von Pyruvat, Laktat, Glutathion/Glutathiondisulfid und NAD^+/NADH strahleninduzierte Radikale abzuf puffern. Diese Moleküle sind Produkte des Glukose-Metabolismus. Mittels Blockade von PFKFB3 durch 3PO und einer damit einhergehenden intrazellulären Abnahme der Konzentration der Moleküle ist die strahlensensibilisierende Wirkung von 3PO nachzuvollziehen (Sattler und Mueller-Klieser 2009). Veränderungen des Glukose-Metabolismus gehen mit Störungen der mitochondrialen Funktion in Krebszellen einher (Zong et al. 2016). Am Beispiel des Glioblastoms und des KRK entdeckten unterschiedliche Arbeitsgruppen, dass Anomalien in der Funktion von Mitochondrien zu einer Strahlenresistenz führten. Der Transfer normaler menschlicher astrozytärer Mitochondrien konnte die Sensitivität gegenüber RT in Gliomzellen verstärken (Sun et al. 2019). Anhand des KRK wurde gezeigt, dass durch Störungen des respiratorischen Komplexes I, einem Schlüsselprotein der Atmungskette, die

Ausbildung von Strahlenresistenzen begünstigt wurde. Durch die Wiederherstellung der Funktionalität des Komplexes I konnten Krebszellen *in vivo* und *in vitro* gegenüber RT sensibilisiert werden (Shi et al. 2021). Daraus schlussfolgernd könnte die Blockade der Glykolyse durch 3PO Einfluss auf den mitochondrialen Stoffwechsel in Krebszellen nehmen und diese gegenüber RT sensibilisieren. ATP nimmt als wichtiger Energielieferant eine zentrale Rolle in der Reparatur von DNA-Schäden ein (Hopfner et al. 2000; Bakkenist und Kastan 2004). Während einer Drosselung der Glykolyse durch 3PO sinkt der intrazelluläre ATP-Spiegel ab (Clem et al. 2008). Dadurch steht Krebszellen weniger ATP zur Verfügung, um die erforderlichen Reparaturmechanismen absolvieren zu können (Pelicano et al. 2006). Zudem haben Gustafsson et al. (2018) beschrieben, dass eine Inhibition von PFKFB3 zu einer Abnahme des DNA-Reparatur Proteins RAD51 führte. Der damit einhergehende Verlust der homologen Rekombination bewirkte, dass strahleninduzierte DSB nicht repariert werden konnten. Andererseits könnte 3PO den Zellzyklus von Tumorzellen beeinflussen. Durch Clem et al. (2008) wurde 3PO erstmals beschrieben und charakterisiert. Demnach induzierte 3PO einen G₂-M-Phase Zellzyklusarrest in Krebszellen. Auf Grundlage von Versuchen an chinesischen Hamsterzellen durch Warren K. Sinclair in den 1960er Jahren wurde erstmals beschrieben, dass Zellen in der G₂-M-Phase besonders strahlensensibel sind (Sinclair und Morton 1966). Die Induktion des G₂-M-Phasen Zellzyklusarrests durch 3PO könnte demnach die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung erhöhen.

Die Auswirkung ionisierender Strahlung auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Tumorzellen wird in der Literatur vielfältig beschrieben. Verschiedene Erklärungen des Mechanismus der strahleninduzierten Migration und Invasion sind bereits etabliert. Dabei nimmt die strahleninduzierte Abnahme der Expression von VE-Cadherinen sowie die gesteigerte Expression degradierender Proteasen eine zentrale Stellung ein (Speake et al. 2005; Jung et al. 2007). Um die Auswirkung der dualen Therapie mit Bestrahlung und 3PO auf die Migration und Invasion von Zellen zu untersuchen, wurde ein Wundheilungs- und Invasions-Assay durchgeführt. Gegenüber der Kontrolle erbrachte die Kombinationstherapie eine Abnahme der Migration und Invasion beider KRK-Zelllinien. Anhand von Versuchen mit HCT-116 Zellen belegen frühere Studien, dass die Migration unter Bestrahlung in hohen Dosen (10 Gy) abnehmen kann. Jedoch wurde in parallelen Versuchen eine Zunahme der Migration bei 1 Gy und 3 Gy beobachtet. In weiteren Experimenten wurden wiederum keine Veränderungen der Migrationsfähigkeit von HCT-116 Zellen festgestellt (Goetze et al. 2007). Die Versuche mit HT-29 Zellen zeigten eine Zunahme der Migration der bestrahlten Krebszellen. Eine Vielzahl von Studien belegt, dass ionisierende Strahlung die Migrationsfähigkeit und Invasivität von Krebszellen fördern kann (Moncharmont et al. 2014). In Experimenten

mit U251 Zellen und U87 Zellen (Hirntumorzellen), DU-SCC5 Zellen (Kopf-Hals Tumorzellen) und MDA-MD-231 Zellen (Brustkrebszellen) konnte eine strahleninduzierte gesteigerte Migration bzw. Invasion festgestellt werden (de Bacco et al. 2011; Badiga et al. 2011; Beck et al. 2012; Rieken et al. 2012).

4.3 Einschränkungen der *In-vitro*-Versuche

Solide Tumoren sind gekennzeichnet durch besondere Aspekte in ihrem Metabolismus. In Beziehung zur Tumormikroumgebung und genetischen Veränderungen der Zellen entstehen einzigartige und komplexe Wechselwirkungen. Diese sind bei *In-vitro*-Versuchen nicht vollständig reproduzierbar und stellen eine Limitation der Methodik dar (Papandreou et al. 2011). Tumoren sind aufgrund der abnormalen Architektur der Tumorblutgefäße durch hypoxische Areale gekennzeichnet. Jedoch wurden alle Zellen in der Zellkultur unter standardisierten sauerstoffreichen Bedingungen kultiviert und waren komplett unabhängig von einer Gefäßversorgung. Hypoxie-Kammern stellen eine Möglichkeit dar, um Zellen unter sauerstoffarmen Bedingungen zu kultivieren (Bakmiwewa et al. 2015).

Zusammenfassend ergab die Inhibition von PFKFB3 durch 3PO eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferation, der Migration und Invasivität *in vitro*. Anhand des Koloniebildungstests konnte eine strahlensensibilisierende Wirkung von 3PO auf Zelllinien des KRK festgestellt werden. In Kombination mit ionisierender Strahlung wurde weiterhin eine 3PO-induzierte Abnahme der Zellproliferation sowie Zunahme der LDH-Freisetzung beobachtet. In Anbetracht der Ergebnisse des Migrations- und Invasions-Assay wurde verdeutlicht, dass eine Kombination von ionisierender Strahlung mit 3PO der strahleninduzierten Migration und Invasion entgegenwirken kann.

4.4 Etablierung von PDX-Mausmodellen des KRK und Einschränkungen der *In-vivo*-Versuche

Für die *In-vivo*-Versuche wurden PDX-Mausmodelle des KRK etabliert. Für das Versuchsmodell wurden PrkdcScid-Mäuse verwendet. Aufgrund der beeinträchtigten Entwicklung von T- und B-Lymphozyten ist dieses Mausmodell besonders geeignet, um xenogene Transplantate zu transferieren (Bosma et al. 1983). Hypothesen früherer Studien folgend, könnten PFKFB3-Inhibitoren pleiotrope Wirkungen auf das Immunsystem nehmen (Clem et al. 2013). Aufgrund des Immundefektes der PrkdcScid-Mäuse könnte das Tumorwachstum sowie die Tumorbiologie beeinflusst werden. Weiterhin könnten Veränderungen der Interaktion zwischen Krebszellen und dem immunologischen Mikromilieu nicht ausgeschlossen

werden. Xenograft-Modelle, die direkt von Patient*innenproben abgeleitet werden, sind von besonderer Bedeutung, da sie tumorbiologische Charakteristika des humanen Tumors aufzeigen. Dadurch bleiben histopathologische Eigenschaften und die molekulare Vielfalt des kolorektalen Primärtumors erhalten. Ein Beispiel stellt die Aufrechterhaltung der Architektur des abnormalen Tumorblutgefäßsystems dar (Julien et al. 2012). Präklinische *In-vivo*-Versuchsmodelle sind wichtig, um die Wirkung neuer Substanzen einschätzen und bewerten zu können. PDX-Tumoren können schnell in große Behandlungskohorten transplantiert werden. Die transplantierten PDX-Tumoren sind per Schieblehre messbar, wodurch Therapieeffekte einfach und valide dokumentiert und ausgewertet werden können. Im Vergleich zur Schieblehre stellt die Ultraschallbildgebung eine präzisere und reproduzierbarere Methode zur Bestimmung der Tumorumfänge dar. Studien zeigten, dass unter Einsatz von Ultraschall 30 % weniger Versuchstiere benötigt wurden, um statistische Unterschiede zu ermitteln (Ayers et al. 2010). Ein Kritikpunkt an PDX-Modellen besteht in der langen Wachstumsphase der Tumoren bis zum Therapiestart. Zudem werden Tumorproben mit einer Größe von 2 x 2 mm implantiert, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass biologische Eigenschaften des Primärtumors, die sich nur im Restgewebe befinden, verloren gehen. Letztendlich nehmen PDX-Modelle jedoch eine sehr bedeutende Stellung in der Forschung ein. Histologische und molekulare Untersuchungen am PDX-Tumor sind im Anschluss an die Behandlungsversuche leicht durchführbar. Eine interessante Alternative stellen PD-Organoiden dar. Einerseits weisen Tumororganoiden ebenfalls histologische und genetische Merkmale des Primärtumors auf. Andererseits eignen sich Tumororganoiden besser als PDX-Tumoren als prädiktive Modelle, weil die Wachstumsphase von Tumororganoiden mit etwa zwei Wochen weitaus kürzer ist im Vergleich zu PDX-Mausmodellen (Tuveson und Clevers 2019; Yao et al. 2020). Jedoch treffen die Nachteile bezüglich der Sauerstoffversorgung und Mikroumgebung (siehe Kap. 4.3) ebenfalls auf Experimente mit Organoiden zu.

4.5 3PO kombiniert mit RT/RCT nimmt Einfluss auf die Tumervaskularisierung und induziert eine TVN

Hypoxie stellt ein Hindernis für eine wirksame Strahlentherapie dar. Unterschiedliche Konzepte zur Überwindung der Tumorphypoxie wurden bereits erforscht. Zu diesen Versuchen zählte der Einsatz von Hämoglobin-basierten Sauerstoff-Carriern, von hyperbaren Sauerstoff und von Hypoxie-aktivierten Prodrugs (HAPs). Häufig sind diese Studien aufgrund geringer Wirksamkeit oder unerwünschter Nebenwirkungen erfolglos geblieben (Graham und Unger 2018). Ein gelungener Ansatz war die Entwicklung von HAPs. Mitomycin-C ist

ein entsprechendes Beispiel. HAPs werden im hypoxischen Milieu enzymatisch reduziert und in zytotoxische Spezies umgewandelt (Yeh und Kim 2015). Heutzutage wird Mitomycin-C erfolgreich in Kombination mit 5FU und RT zur Behandlung des Analkarzinoms eingesetzt (Flam et al. 1996). Eine Übersichtsarbeit an 10.108 Patient*innen aus 86 randomisierten Studien untersuchte den Einfluss der Minderung der Tumorphoxie auf die Wirkung der primären Strahlentherapie. Eine Senkung der Tumorphoxie verbesserte signifikant den Effekt der Strahlenbehandlung. Der Gesamtüberlebensvorteil wird mit einer Odds Ratio von 0,87 (95 % Konfidenzintervall, 0,80 bis 0,95) angegeben (Overgaard 2007). Weiterführende Untersuchungen und die Entwicklung neuer Ansätze zur Minderung der Tumorphoxie sind deswegen von großem Interesse. Als ein Regulator der Angiogenese nimmt PFKFB3 Einfluss auf die Gefäßarchitektur von Tumorblutgefäßen. Aus diesem Grund wurden nach Abschluss der Therapie der PDX-Mausmodelle, Endothelzellen per CD31-Färbung markiert und untersucht. In beiden *In-vivo*-Versuchen wurde kein Einfluss von 3PO auf die CD31-positive Fläche (entspricht der Dichte der Tumorgefäße) gemessen. Dieses Ergebnis ist kongruent mit Studienergebnissen, die aufzeigten, dass die Tumorgefäßdichte im Rahmen der TVN nicht beeinflusst wird (Mazzone et al. 2009; Carmeliet und Jain 2011; Jain 2014; Cantelmo et al. 2016). Analysen zur Lumengröße zeigten hingegen eine signifikante Zunahme der Lumengröße der mit 3PO behandelten Tumoren gegenüber den Kontrollkohorten. Dies wurde ebenfalls in früheren Studien am Beispiel von B16-F10 Tumoren berichtet (Cantelmo et al. 2016). Eine interessante Hypothese für diese Beobachtung steht im Zusammenhang mit der vermehrten Expression von VE-Cadherin in Endothelzellen, die durch PFKFB3 inhibiert werden. Dem Gesetz von Laplace folgend, verhält sich die Spannung der Gefäßwand proportional zum Radius der Gefäße. Aufgrund der verstärkten VE-Cadherin-Expression könnten Endothelzellen in der Lage sein, einer größeren Wandspannung standzuhalten und dementsprechend ihr Lumen zu vergrößern (Cantelmo et al. 2016). Interessanterweise zeigten beide Therapiegruppen, die allein mit RT/RCT behandelt wurden, eine signifikante Abnahme der Gefäßanzahl. Die Schädigung des Gefäßsystems ist ein zentraler Faktor bei der Entstehung von Nebenwirkungen in der Strahlentherapie. Die Auswirkung ionisierender Strahlung auf das Endothel wurde in der Literatur wiederholt beschrieben. Untersuchungen an HUVEC legten dar, dass durch die strahleninduzierte Aktivierung der Metalloproteinase ADAM10 der Abbau von VE-Cadherin verstärkt wird. Dieser Mechanismus führt zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels (Kouam et al. 2019). *In-vivo*-Studien ergaben, dass Bestrahlung DNA-DSB in Endothelzellen induziert. Das Endothel war das früheste Gewebe, das Apoptose in der bestrahlten Lunge von C3H/HeJ-Mäusen einleitete (Fuks et al. 1994; Fuks et al. 1995). Insgesamt lässt sich vermuten, dass die Abnahme der Gefäßanzahl und der

CD31-positiven Fläche durch die RT vermittelt wurde. Interessanterweise führte die alleinige RT zu einer signifikanten Zunahme der Lumengröße. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Erkenntnissen, die Mitte der 80er Jahre erstmals anhand von *In-vivo*-Studien beschrieben wurden. Dieses Ergebnis könnte auf eine kompensatorische Dilatation überlebender, nicht geschädigter Gefäße nach RT hindeuten (Dimitrievich et al. 1984). Um die Funktionalität der Gefäße zu überprüfen, wurde mittels Pimonidazol-Färbung die hypoxische Fläche der Tumoren bestimmt. Die Oxygenierung von Tumoren kann als zentraler Indikator der TVN betrachtet werden (Martin et al. 2019). Die alleinige Therapie mit 3PO führte in beiden *In-vivo*-Versuchen zu einer signifikanten Abnahme der hypoxischen Fläche. Weiterhin wurde auch bei beiden Therapiegruppen eine signifikante Abnahme der Tumorphoxie gemessen, wenn 3PO zusätzlich zur RT/RCT appliziert wurde. Diese Ergebnisse verdeutlichen erstmalig die Induktion der TVN durch 3PO am Beispiel des KRK. Bisherige *In-vivo*-Studien belegten eine Abnahme der hypoxischen Tumorfläche während der Therapie mit 3PO am Beispiel eines Maus-Melanom- und Maus-Glioblastom-Modells (Cantelmo et al. 2016; Zhang et al. 2020).

4.6 Die Kombinationstherapie aus 3PO und RT/RCT senkt die Tumorzellproliferation *in vivo*

Das Ziel dieser Arbeit war, die Auswirkung von RT und RCT in Kombination mit 3PO auf PDX-Mausmodelle des KRK zu untersuchen. Der PFKFB3-Inhibitor 3PO wurde bereits in verschiedenen *In-vivo*-Studien eingesetzt (Clem et al. 2008; Cantelmo et al. 2016; Conradi et al. 2017; Zhang et al. 2020). Zuletzt wurde die Auswirkung einer PFKFB3-Blockade durch 3PO in Kombination mit dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab und Doxorubicin anhand eines Glioblastom-Mausmodells untersucht. Glioblastomzellen wurde den Versuchstieren intrakraniell injiziert. Die Therapie erfolgte durch die intravenöse Gabe von Doxorubicin allein, in Kombination mit 3PO bzw. Bevacizumab oder als Dreifachkombination. Nach Therapieende wurde die höchste intratumorale Anreicherung von Doxorubicin in Tumoren gemessen, die mit der Dreifachtherapie behandelt wurden. Das Tumorwachstum wurde signifikant gesenkt. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass die duale Blockade von VEGF und PFKFB3 einen Tumorblutgefäß normalisierenden Effekt beim Glioblastom induzierte und die Wirksamkeit der Chemotherapie erhöhte (Zhang et al. 2020).

Das Tumorwachstum von Maus-Xenograft-Modellen des Endometriumkarzinoms wurde durch den Einsatz des PFKFB3-Inhibitors PFK158 allein und in Kombination mit Carboplatin reduziert. Analysen der Tumorgewebsschnitte nach Therapieende ergaben, dass

PFK158 sowie die Kombinationsbehandlung die Tumornekrose gegenüber der Kontrollkohorte signifikant steigerte. Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen war in beiden Kohorten erhöht. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass durch die Inhibition von PFKFB3 durch PFK158 die antitumorale Wirksamkeit verstärkt wurde (Xiao et al. 2021).

In vorangegangenen Studien wurde 3PO *in vivo* eingesetzt, um vorrangig die Proliferation von Krebszellen zu hemmen und das Tumorstadium zu reduzieren (Clem et al. 2008; Cantelmo et al. 2016). Ergebnisse früherer Studien verdeutlichten, dass unter Verwendung einer geringen Dosierung von 3PO eine TVN *in vivo* erreicht werden konnte (Conradi et al. 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Versuchstiere mit fünf Injektionen 3PO (25 mg/kg) vorbehandelt, um eine TVN zu induzieren. Im Anschluss an die Induktion der TVN erfolgte die RT bzw. die i. p. Gabe von 5FU in Kombination mit RT. Die Monotherapie mit 3PO erbrachte bei beiden Behandlungsgruppen keine Abnahme des Tumorstadiums. Dies entspricht Ergebnissen verschiedener *In-vivo*-Studien (Cantelmo et al. 2016; Zhang et al. 2020). Eine signifikante Abnahme des Tumorstadiums gegenüber der Kontroll-Kohorte wurde bei alleiniger RT und RT in Kombination mit 3PO beobachtet. Ab dem 15. Therapietag zeigte sich bei beiden Kohorten eine signifikante Abnahme der Tumorstadiums. Die Bildung eines Tumorstadiums nach abgeschlossener Behandlung von Krebserkrankungen stellt ein klinisches Problem dar. Aus diesem Grund wurde das Tumorstadium der RT-Kohorte und der RT+3PO-Kohorte nach Abschluss der Behandlung für einen weiteren Monat beobachtet. In diesem Zeitraum trat in keiner der beiden Kohorten ein erneutes Wachstum der s. c. lokalisierten Tumoren auf. Während des gesamten Therapieversuchs und der Nachbeobachtungsphase wurden keine Unterschiede der Tumorstadiums zwischen der RT-Kohorte und RT+3PO-Kohorte gemessen. Gewichtsunterschiede der Tumoren nach der Explantation wurden zwischen der RT-Kohorte und der Kombinationstherapie ebenfalls nicht ermittelt. Der Tumor HROC239 (Rektumkarzinom) sprach sensibel auf die Strahlentherapie an. Ein zusätzlicher klinischer Nutzen von 3PO konnte anhand des Tumor-Volumen-Index und der Tumorgewichte nach Explantation nicht erreicht werden. In einer 2018 veröffentlichten Publikation wurde der Tumor HROC239 funktionell und genetisch charakterisiert. Durch die Überführung von *In-vivo*-Xenografts in kultivierte Zelllinien *in vitro* wurden unter anderem die Chemo- und Radiosensitivität ermittelt. Der Tumor HROC239 wies eine PTEN-Mutation auf (Gock et al. 2018). Der PI3K/PTEN/AKT/mTOR-Signalweg nimmt eine wesentliche Rolle in der Vermittlung von Arzneimittelresistenzen, der Entstehung von Tumoren und dem Fortschreiten von Krebs ein (Costa et al. 2015). Interessanterweise zeigen Patient*innen mit Rektumkarzinom, die eine *PTEN*-Mutation aufweisen, ein gesteigertes

Ansprechen auf eine RCT gegenüber solchen mit Wildtyp (Peng et al. 2018). Daraus lässt sich die ausgeprägte Strahlenempfindlichkeit des Tumors HROC239 ableiten.

Weiterhin wurde die Auswirkung der Kombination einer RCT mit 3PO an PDX-Mausmodellen des KRK untersucht. Die RCT-Kohorte und auch die RCT+3PO-Kohorte wiesen eine signifikante Abnahme der Tumorgrößen auf. Bereits zwölf Tage nach Therapiebeginn wurde eine anhaltende signifikant verringerte Tumorgröße der RCT+3PO-Kohorte ermittelt. Nach 17 Tagen kam ein anhaltendes signifikant reduziertes Tumorwachstum der RCT-Kohorte hinzu. Ein verbessertes klinisches Ansprechen der Tumoren blieb bei einer zusätzlichen Applikation von 3PO aus. Sowohl die Tumor-Volumen-Indexe als auch die Tumorgewichte nach Explantation wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen der RCT- und RCT+3PO-Kohorte auf.

Zusätzliche histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen waren daher essenziell, um den Effekt der Therapien im Detail beurteilen zu können. Anhand von Tumorgewebsschnitten wurde die residuale Tumorfläche nach Therapieende bestimmt. Der signifikante Rückgang der residualen Tumorfläche bei zusätzlicher Gabe von 3PO verdeutlicht einen synergistischen Therapieeffekt der PFKFB3-Blockade in Kombination mit RT. Dieser Effekt könnte auf einen 3PO-induzierten Anstieg des Sauerstoffgehalts im Tumorgewebe aufgrund der TVN zurückzuführen sein, der die ROS-vermittelte Fixierung von DNA-Schäden verstärken könnte. Um diese These wissenschaftlich zu belegen, wären zusätzliche Analysen des Tumorgewebes mittels eines γ -H2Ax-Assays empfehlenswert. Die Bildung von γ -H2Ax als Reaktion auf DNA-DSB bietet die Möglichkeit, durch RT induzierte DNA-Schäden zu detektieren (Ivashkevich et al. 2012). Die Analyse der RCT-Kohorte ergab keinen zusätzlichen Nutzen, wenn 3PO mit einer RCT kombiniert wurde. Insgesamt zeigte sich, dass PDX-Tumoren der RCT-Kohorte bereits ein sehr hohes Ansprechen auf die Therapie aufwiesen. Ein synergistischer Effekt von 3PO wurde dadurch eventuell verdeckt. Dieses Ergebnis bestätigt jedoch die hohe Wirksamkeit des RCT-Regimes in der Behandlung des Rektumkarzinoms.

Die Applikation von 3PO als Monotherapie führte in beiden tierexperimentellen Versuchen zu keiner Veränderung der Tumorzellproliferation. Frühere *In-vivo*-Studien an B16-F10 Tumoren ergaben bei der gleichen Dosierung von 3PO (25 mg/kg) ebenfalls keine Reduktion der Krebszellproliferation. Höhere Dosierungen von 3PO führten jedoch zu einer signifikanten Abnahme (Cantelmo et al. 2016). Die dabei verwendete Dosierung von 75 mg/kg 3PO überstieg die hier verwendete Dosis um das Dreifache. Der antiproliferative Effekt des PFKFB3-Inhibitors 3PO wurde in unterschiedlichen *In-vivo*-Studien bereits beschrieben

(Clem et al. 2008; Conradi et al. 2017). Interessanterweise wurde eine signifikante Zunahme des Proliferationsindex nach Therapie mit RT bzw. RCT gemessen. Ob dieses Ergebnis eine selektive Persistenz, ein erneutes Wachstum von aggressiven Tumorklonen oder eine schrittweise klonogene Progression kennzeichnet, ist nicht umfassend erklärbar. Weitere Untersuchungen des Tumorgewebes mittels Caspase 3 und TUNEL-Färbung könnten Aufschluss zum Zelltod geben und Unterschiede zwischen den Behandlungskohorten aufdecken.

4.7 Ausblick

Nach Angaben der globalen Krebsstatistik 2020 wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an KRK, insbesondere bei jüngeren Patient*innen, in den kommenden Jahrzehnten deutlich ansteigen (Xi und Xu 2021; Sung et al. 2021). Umso wichtiger ist eine wirksame onkologische Therapie auf höchstem Niveau und nach aktuellem Wissensstand.

Gegenwärtig wird der Begriff der totalen neoadjuvanten Therapie (TNT) zunehmend etabliert (Fokas et al. 2019). Die TNT beinhaltet eine präoperative Chemotherapie, welche ergänzend zur präoperativen RT bzw. RCT eingesetzt wird. Die zusätzliche Systemtherapie kann nach einer kompletten Tumorremission, einen Organerhalt bedeuten. Aktuell laufende Studien untersuchen den Erfolg der TNT bei Patient*innen mit lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (z. B.: ACO/ARO/AIO-18.1-Rektumstudie, *German Rectal Cancer Study Group*).

In der randomisiert-kontrollierten Phase-3-Studie RAPIDO konnten im Zeitraum von 2011 bis 2016 920 Patient*innen rekrutiert werden. Die Patient*innen im Kontrollarm wurden mittels neoadjuvanter RCT gefolgt von einer nach 6 bis 10 Wochen anschließenden Operation sowie einer adjuvanten Chemotherapie behandelt. Dem gegenüber wurden Patient*innen im experimentellen Therapiearm mit einer Kurzzeitbestrahlung (5 x 5 Gy), gefolgt von einer neoadjuvanten Chemotherapie und anschließender Operation therapiert. Die Studie verdeutlichte, dass die TNT (experimenteller Arm der Studie) die Rate an krankheitsbedingtem Therapieversagen im Vergleich zur Standardtherapie (Kontrollarm) signifikant reduzierte. Die pathologische Komplettremission konnte von 14 % im Kontrollarm auf 28 % im experimentellen Arm erhöht werden (Bahadoer et al. 2021). Die Ergebnisse der RAPIDO-Studie heben den Stellenwert der TNT in der Behandlung des Rektumkarzinoms hervor.

Die Auswirkungen einer PFKFB3-Blockade in Kombination mit einer Kurzzeitbestrahlung (5 x 5 Gy), gefolgt von einer adjuvanten Chemotherapie, entsprechend dem Prinzip der TNT, könnte in weiteren Versuchen anhand von In-vivo-Modellen überprüft werden.

5 Zusammenfassung

In Deutschland erkranken jährlich ca. 60.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom (KRK). Die neoadjuvante Radiotherapie (RT) bzw. Radiochemotherapie (RCT) stellt einen wichtigen Teil der Behandlung von Patient*innen dar. Das Ansprechen von Patient*innen auf die präoperative RCT ist heterogen. Um die Ausbildung von Strahlenresistenzen zu mindern, ist es wichtig, bestehende Behandlungsansätze zu überprüfen und zu optimieren.

Ein gesteigerter Glukose-Metabolismus und eine verstärkte Neoangiogenese zählen zu den *Hallmarks of Cancer* und sind von besonderem Interesse, um neue Behandlungsansätze in der Krebstherapie zu entwickeln. Das bifunktionelle Enzym PFKFB3 stellt einen vielversprechenden Angriffspunkt dar. Einerseits nimmt PFKFB3, als ein indirekter Stimulator der Glykolyse, Einfluss auf die glykolytische Aktivität von Krebszellen, andererseits ist PFKFB3 an der Normalisierung von Tumorblutgefäßen beteiligt. Eine Vielzahl von Tumoren, wie auch das KRK, sind durch eine verstärkte PFKFB3-Expression gekennzeichnet. Dies macht PFKFB3 zu einem attraktiven Ziel in der Therapie des KRK. Ein potenter Inhibitor von PFKFB3 ist 3PO.

Die Auswirkungen einer PFKFB3-Blockade auf Zelllinien des KRK wurden durch Analysen zur Zellproliferation, Zelltod, Invasivität und Migrationsfähigkeit untersucht. Um eine mögliche radiosensibilisierende Wirkung von 3PO in Kombination mit Bestrahlung zu überprüfen, wurde ein Koloniebildungstest durchgeführt. Im Anschluss wurden anhand zweier *In-vivo*-Studien die Auswirkungen von 3PO in Kombination mit RT und RCT auf PDX-Tumoren des KRK ermittelt.

Die Ergebnisse der *In-vitro*-Studien ergaben, dass 3PO konzentrationsabhängig die Zellproliferation, Zellmigration sowie Zellinvasion reduziert und den Zelltod verstärkt. Weiterhin verdeutlichten die Resultate der *In-vitro*-Experimente, dass die Blockade von PFKFB3 durch 3PO den strahleninduzierten Zelltod von kolorektalen Krebszellen erhöht und gleichzeitig die Krebszellmigration und Krebszellinvasion reduziert. Die neoadjuvante Behandlung mit 3PO induzierte eine Tumorblutgefäßnormalisierung *in vivo*. Die Tumorphypoxie wurde signifikant gesenkt. Die Fläche der Tumorblutgefäßlumen wurde vergrößert. Weiterhin wurde histologisch eine signifikante Abnahme der residualen Tumorphäche sowie Reduktion der Tumorzellproliferation ermittelt. Dies verdeutlicht das verbesserte Ansprechen der Tumoren auf die Kombinationstherapie mit 3PO. Sowohl die Tumor-Volumen-Indexe als auch die Tumormasse nach Explantation zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse dieser Dissertation verdeutlichen, dass die Blockade von PFKFB3 durch 3PO ein potenzielles therapeutisches Ziel darstellt, um eine Normalisierung von Tumorblutgefäßen in menschlichem KKK zu induzieren, die Tumorphypoxie zu mindern und folglich die Strahlensensibilität zu erhöhen.

Insgesamt unterstützen die *In-vitro*- und *In-vivo*-Ergebnisse den Einsatz von 3PO, um die derzeitigen etablierten Therapieansätze des Rektumkarzinoms weiter zu verbessern.

6 Literaturverzeichnis

- Al-Taie O, Mörk H, Seufert J, Treis H, Jakob F, Scheurlen M (2001): Hereditäres Non-Polyposis kolorektales Karzinom (HNPCC). Aktuelle Übersicht zur Ätiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie. *Med Klin (Munich)* 96, 529–538
- Anoopkumar-Dukie S, Carey JB, Conere T, O'sullivan E, van Pelt FN, Allshire A (2005): Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Br J Radiol* 78, 945–947
- 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
- Ayers GD, McKinley ET, Zhao P, Fritz JM, Metry RE, Deal BC, Adlerz KM, Coffey RJ, Manning HC (2010): Volume of preclinical xenograft tumors is more accurately assessed by ultrasound imaging than manual caliper measurements. *J Ultrasound Med* 29, 891–901
- Badiga AV, Chetty C, Kesanakurti D, Are D, Gujrati M, Klopfenstein JD, Dinh DH, Rao JS (2011): MMP-2 siRNA inhibits radiation-enhanced invasiveness in glioma cells. *PLoS ONE* 6, e20614
- Bahadoer RR, Dijkstra EA, van Etten B, Marijnen CAM, Putter H, Kranenbarg EMK, Roodvoets AGH, Nagtegaal ID, Beets-Tan RGH, Blomqvist LK et al. (2021): Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 22, 29–42
- Bakkenist CJ, Kastan MB (2004): Initiating cellular stress responses. *Cell* 118, 9–17
- Bakmiwewa SM, Heng B, Guillemin GJ, Ball HJ, Hunt NH (2015): An effective, low-cost method for achieving and maintaining hypoxia during cell culture studies. *Biotechniques* 59, 223–229
- Barnett GC, West CML, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PDP, Burnet NG (2009): Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer* 9, 134–142
- Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW (2012): Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci* 9, 193–199
- Beck C, Piontek G, Haug A, Bas M, Knopf A, Stark T, Mißlbeck M, Rudelius M, Reiter R, Brandstetter M et al. (2012): The kallikrein-kinin-system in head and neck squamous

- cell carcinoma (HNSCC) and its role in tumour survival, invasion, migration and response to radiotherapy. *Oral Oncol* 48, 1208–1219
- Bertout JA, Patel SA, Simon MC (2008): The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 967–975
- Bhatt AN, Chauhan A, Khanna S, Rai Y, Singh S, Soni R, Kalra N, Dwarakanath BS (2015): Transient elevation of glycolysis confers radio-resistance by facilitating DNA repair in cells. *BMC Cancer* 15, 335
- Boffetta P, Hashibe M (2006): Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 7, 149–156
- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983): A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, 527–530
- Braselmann H, Michna A, Heß J, Unger K (2015): CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiat Oncol* 10, 223
- 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
- Cantelmo AR, Conradi LC, Brajic A, Goveia J, Kalucka J, Pircher A, Chaturvedi P, Hol J, Thienpont B, Teuwen LA 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
- Carmeliet P, Jain RK (2011): Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 10, 417–427
- Cash TP, Pan Y, Simon MC (2007): Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med* 43, 1219–1225
- 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, e20456
- 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 LC, Brajic A, Cantelmo AR, Bouché A, Kalucka J, Pircher A, Brüning U, Teuwen LA, Vinckier S, Ghesquière B et al. (2017): Tumor vessel disintegration by maximum tolerable PFKFB3 blockade. *Angiogenesis* 20, 599–613
- Costa C, Pereira S, Lima L, Peixoto A, Fernandes E, Neves D, Neves M, Gaitero C, Tavares A, da Gil Costa RM et al. (2015): Abnormal Protein Glycosylation and Activated PI3K/Akt/mTOR Pathway: Role in Bladder Cancer Prognosis and Targeted Therapeutics. *PLoS ONE* 10, e0141253
- de Bacco F, Luraghi P, Medico E, Reato G, Girolami F, Perera T, Gabriele P, Comoglio PM, Boccaccio C (2011): Induction of MET by ionizing radiation and its role in radio-resistance and invasive growth of cancer. *J Natl Cancer Inst* 103, 645–661
- de Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Eelen G et al. (2013): Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154, 651–663
- de Oliveira T, Goldhardt T, Edelmann M, Rogge T, Rauch K, Kyuchukov ND, Menck K, Bleckmann 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
- Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M (2005): The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* 104, 1129–1137
- Dimitrievich GS, Fischer-Dzoga K, Griem ML (1984): Radiosensitivity of vascular tissue. I. Differential radiosensitivity of capillaries: a quantitative in vivo study. *Radiation Research* 99, 511–535
- Du JY, Wang LF, Wang Q, Yu LD (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. *Oncol Rep* 33, 1890–1898
- Edge SB: *AJCC cancer staging manual*, 7th ed; Springer, New York 2010
- Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO (1990): Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *New England Journal of Medicine* 323, 1228–1233
- Evans SM, Koch CJ (2003): Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. *Cancer Letters* 195, 1–16
- Fearon ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767
- Ferrara N (2002): VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2, 795–803

- Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, Hardcastle J D., Hermanek P, Jass JR, Newland RC (1991): Clinicopathological staging for colorectal cancer: An International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J Gastroenterol Hepatol* 6, 325–344
- Flam M, John M, Pajak TF, Petrelli N, Myerson R, Doggett S, Quivey J, Rotman M, Kerman H, Coia L et al. (1996): Role of mitomycin in combination with fluorouracil and radiotherapy, and of salvage chemoradiation in the definitive nonsurgical treatment of epidermoid carcinoma of the anal canal: results of a phase III randomized intergroup study. *J Clin Oncol* 14, 2527–2539
- Fokas E, Allgäuer M, Polat B, Klautke G, Grabenbauer GG, Fietkau R, Kuhnt T, Staib L, Brunner T, Grosu AL 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. *J Clin Oncol* 37, 3212–3222
- Fokas E, Ströbel P, Fietkau R, Ghadimi M, Liersch T, Grabenbauer GG, Hartmann A, Kaufmann M, Sauer R, Graeven U et al. (2017): Tumor Regression Grading After Preoperative Chemoradiotherapy as a Prognostic Factor and Individual-Level Surrogate for Disease-Free Survival in Rectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 109
- Folkman J (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 285, 1182–1186
- Folkman J, Long DM, Becker FF (1963): Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 16, 453–467
- Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC (1999): Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *New England Journal of Medicine* 340, 169–176
- Fuks Z, Alfieri A, Haimovitz-Friedman A, Seddon A, Cordon-Cardo C (1995): Intravenous basic fibroblast growth factor protects the lung but not mediastinal organs against radiation-induced apoptosis in vivo. *Cancer J Sci Am* 1, 62–72
- Fuks Z, Persaud RS, Alfieri A, McLoughlin M, Ehleiter D, Schwartz JL, Seddon AP, Cordon-Cardo C, Haimovitz-Friedman A (1994): Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res* 54, 2582–2590
- Georgiou P, Tan E, Gouvas N, Antoniou A, Brown G, Nicholls RJ, Tekkis P (2009): Extended lymphadenectomy versus conventional surgery for rectal cancer: a meta-analysis. *The Lancet Oncology* 10, 1053–1062
- Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke H-D (2001): Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue™. *Journal of Immunological Methods* 252, 131–138

- Gock M, Mullins CS, Bergner C, Prall F, Ramer R, Göder A, Krämer OH, Lange F, Krause BJ, Klar E et al. (2018): Establishment, functional and genetic characterization of three novel patient-derived rectal cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 24, 4880–4892
- Goetze K, Scholz M, Taucher-Scholz G, Mueller-Klieser W (2007): The impact of conventional and heavy ion irradiation on tumor cell migration in vitro. *Int J Radiat Biol* 83, 889–896
- Gonzalez R, Tarloff J (2001): Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicology in Vitro* 15, 257–259
- Graham K, Unger E (2018): Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Int J Nanomedicine* 13, 6049–6058
- Gray LH, Conger AD, Eber M, Hornsey S, Scott OC (1953): The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26, 638–648
- 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
- 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
- Hall EJ, Giaccia AJ: *Radiobiology for the radiologist*, 7. ed; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2012
- 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. *Int J Oncol* 48, 215–224
- Heald RJ, Karanjia ND (1992): Results of radical surgery for rectal cancer. *World J Surg* 16, 848–857
- Holthusen H (1921): Beiträge zur Biologie der Strahlenwirkung. *Pflügers Arch.* 187, 1–24
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur L, Carney JP, Tainer JA (2000): Structural Biology of Rad50 ATPase. *Cell* 101, 789–800
- Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, Martin RF, Martin OA (2012): Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Letters* 327, 123–133
- Jackson SP, Bartek J (2009): The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078

- Jain RK (2014): Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell* 26, 605–622
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009): Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59, 225–249
- 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
- Jung JW, Hwang SY, Hwang JS, Oh ES, Park S, Han IO (2007): Ionising radiation induces changes associated with epithelial-mesenchymal transdifferentiation and increased cell motility of A549 lung epithelial cells. *Eur J Cancer* 43
- Kim TK (2015): T test as a parametric statistic. *Korean J Anesthesiol* 68, 540–546
- Kotowski K, Rosik J, Machaj F, Supplitt S, Wiczew D, Jabłońska K, Wiechec E, Ghavami S, Dziegiel P (2021): Role of PFKFB3 and PFKFB4 in Cancer: Genetic Basis, Impact on Disease Development/Progression, and Potential as Therapeutic Targets. *Cancers (Basel)* 13, 909
- Kotowski K, Supplitt S, Wiczew D, Przystupski D, Bartosik W, Saczko J, Rossowska J, Drag-Zalesińska M, Michel O, Kulbacka J (2020): 3PO as a Selective Inhibitor of 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3 in A375 Human Melanoma Cells. *Anticancer Res* 40, 2613–2625
- Kouam PN, Reznicek GA, Adamietz IA, Bühler H (2019): Ionizing radiation increases the endothelial permeability and the transendothelial migration of tumor cells through ADAM10-activation and subsequent degradation of VE-cadherin. *BMC Cancer* 19, 958
- Ladanyi M, Chan WC, Triche TJ, Gerald WL (2001): Expression Profiling of Human Tumors: The End of Surgical Pathology? *J Mol Diagn* 3, 92–97
- Lea MA, Altayyar M, desBordes C (2015): Inhibition of Growth of Bladder Cancer Cells by 3-(3-Pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one in Combination with Other Compounds Affecting Glucose Metabolism. *Anticancer Res* 35, 5889–5899
- Li HM, Yang JG, Liu ZJ, Wang WM, Yu ZL, Ren JG, 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 PS, Chen TY, Giovannucci E (2009): Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 124, 2406–2415
- Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, Qin H (2013): Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS ONE* 8, e53916

- Martin JD, Seano G, Jain RK (2019): Normalizing Function of Tumor Vessels: Progress, Opportunities, and Challenges. *Annu Rev Physiol* 81, 505–534
- Mazzone M, Dettori D, de ORL, Loges S, Schmidt T, Jonckx B, Tian YM, Lanahan AA, Pollard P, de ACR et al. (2009): Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* 136
- Mirzayans R, Andrais B, Murray D (2017): Impact of Premature Senescence on Radiosensitivity Measured by High Throughput Cell-Based Assays. *IJMS* 18, 1460
- Mirzayans R, Scott A, Cameron M, Murray D (2005): Induction of accelerated senescence by gamma radiation in human solid tumor-derived cell lines expressing wild-type TP53. *Radiation Research* 163, 53–62
- Moncharmont C, Levy A, Guy JB, Falk AT, Guilbert M, Trone JC, Alphonse G, Gilormini M, Ardail D, Toillon RA et al. (2014): Radiation-enhanced cell migration/invasion process: a review. *Crit Rev Oncol Hematol* 92, 133–142
- Murray D, Mirzayans R (2013): Role of Therapy-Induced Cellular Senescence in Tumor Cells and its Modification in Radiotherapy: The Good, The Bad and The Ugly. *J Nucl Med Radiat Ther* s6
- Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF (2010): Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost* 36, 321–331
- Okar DA, Lange AJ, Manzano À, Navarro-Sabatè A, Riera L, Bartrons R (2001): PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 30–35
- Overgaard J (2007): Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol* 25, 4066–4074
- Papandreou I, Goliasova T, Denko NC (2011): Anticancer drugs that target metabolism: Is dichloroacetate the new paradigm? *Int J Cancer* 128, 1001–1008
- Pavlova NN, Thompson CB (2016): The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab* 23, 27–47
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P (2006): Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25, 4633–4646
- Peng J, Ma W, Zhou Z, Gu Y, Lu Z, Zhang R, Pan Z (2018): Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway predict tumor response and disease-free survival in locally advanced rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy and radical surgery. *J Cancer* 9, 1067–1077
- Pomp J, Wike JL, Ouwkerk I, Hoogstraten C, Davelaar J, Schrier PI, Leer J, Thames HD, Brock WA (1996): Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays. *Radiotherapy and Oncology* 40, 121–125

- Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG, Hue L (2004): 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* 381, 561–579
- Rieken S, Habermehl D, Wuerth L, Brons S, Mohr A, Lindel K, Weber K, Haberer T, Debus J, Combs SE (2012): Carbon ion irradiation inhibits glioma cell migration through downregulation of integrin expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83, 394–399
- Robert Koch-Institut (Hrsg.) (2016): Epidemiologie von Krebserkrankungen - Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016
- Rödel C, Martus P, Papadoupoulos T, Füzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R et al. (2005): Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 23, 8688–8696
- Ruan K, Song G, Ouyang G (2009): Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem* 107, 1053–1062
- Rustgi AK (2007): The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev* 21, 2525–2538
- 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
- Sattler UGA, Mueller-Klieser W (2009): The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis. *Int J Radiat Biol* 85, 963–971
- Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, Becker H, Raab H-R, Villanueva M-T, Witzigmann H et al. (2012): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* 30, 1926–1933
- Seidensticker P, Schmiegel W (1998): Kolorektales Karzinom. Vorsorge und Früherkennung. *Internist (Berl)* 39, W509-18
- Sgourakis G, Lanitis S, Gockel I, Kontovounisios C, Karaliotas C, Tsiftsi K, Tsiamis A, Karaliotas CC (2011): Transanal endoscopic microsurgery for T1 and T2 rectal cancers: a meta-analysis and meta-regression analysis of outcomes. *Am Surg* 77, 761–772
- Shi L, Pan H, Liu Z, Xie J, Han W (2017): Roles of PFKFB3 in cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2, 17044
- Shi WK, Zhu XD, Wang CH, Zhang YY, Cai H, Li XL, Cao MQ, Zhang SZ, Li KS, Sun HC (2018): PFKFB3 blockade inhibits hepatocellular carcinoma growth by impairing DNA repair through AKT. *Cell Death Dis* 9, 428

- Shi Y, Wang Y, Jiang H, Sun X, Xu H, Wei X, Wei Y, Xiao G, Song Z, Zhou F (2021): Mitochondrial dysfunction induces radioresistance in colorectal cancer by activating Ca²⁺-m-PDP1-PDH-histone acetylation retrograde signaling. *Cell Death Dis* 12, 837
- Sinclair WK (1968): Cyclic X-Ray Responses in Mammalian Cells in Vitro. *Radiation Research* 33, 620
- Sinclair WK, Morton RA (1966): X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. *Radiation Research* 29, 450–474
- Sottnik JL, Lori JC, Rose BJ, Thamm DH (2011): Glycolysis inhibition by 2-deoxy-D-glucose reverts the metastatic phenotype in vitro and in vivo. *Clin Exp Metastasis* 28, 865–875
- Speake WJ, Dean RA, Kumar A, Morris TM, Scholefield JH, Watson SA (2005): Radiation induced MMP expression from rectal cancer is short lived but contributes to in vitro invasion. *European journal of surgical oncology the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 31
- Spitzner M, Emons G, Kramer F, Gaedcke J, Rave-Fränk M, Scharf JG, Burfeind P, Becker H, Beissbarth T, Ghadimi M et al. (2010): A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 78, 1184–1192
- Sun C, Liu X, Wang B, Wang Z, Liu Y, Di C, Si J, Li H, Wu Q, Xu D et al. (2019): Endocytosis-mediated mitochondrial transplantation: Transferring normal human astrocytic mitochondria into glioma cells rescues aerobic respiration and enhances radiosensitivity. *Theranostics* 9, 3595–3607
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209–249
- Taylor FGM, Quirke P, Heald RJ, Moran B, Blomqvist L, Swift I, Sebag-Montefiore DJ, Tekkis P, Brown G (2011): Preoperative high-resolution magnetic resonance imaging can identify good prognosis stage I, II, and III rectal cancer best managed by surgery alone: a prospective, multicenter, European study. *Ann Surg* 253, 711–719
- 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
- Thune I, Lund E (1996): Physical activity and risk of colorectal cancer in men and women. *Br J Cancer* 73, 1134–1140
- Tuveson D, Clevers H (2019): Cancer modeling meets human organoid technology. *Science* 364, 952–955

- van Gijn W, Am Marijnen C, Nagtegaal ID, Kranenbarg EMK, Putter H, Wiggers T, Rutten HJT, Pahlman L, Glimelius B, van de Velde CJH (2011): Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *The Lancet Oncology* 12, 575–582
- van Schaftingen E, Opperdoes FR, Hers HG (1987): Effects of various metabolic conditions and of the trivalent arsenical melarsen oxide on the intracellular levels of fructose 2,6-bisphosphate and of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 166, 653–661
- Vaupel P, Mayer A (2007): Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 26, 225–239
- Veseli B, Perrotta P, van Wielendaele P, Lambeir AM, Abdali A, Bellostta S, Monaco G, Bultynck G, Martinet W, Meyer GRY de (2020): Small molecule 3PO inhibits glycolysis but does not bind to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3). *FEBS Lett*
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Smits AM, Bos JL (1988): Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine* 319, 525–532
- Warburg O (1956): On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123, 309–314
- Wittekind, C. (Hrsg.) (2017): TNM - Klassifikation maligner Tumoren, Achte Auflage; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2017
- Xi Y, Xu P (2021): Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol* 14, 101174
- Xiao Y, Jin L, Deng C, Guan Y, Kalogera E, Ray U, Thirusangu P, Staub J, Sarkar Bhattacharya S, Xu H et al. (2021): Inhibition of PFKFB3 induces cell death and synergistically enhances chemosensitivity in endometrial cancer. *Oncogene* 40, 1409–1424
- Xing JZ, Zhu L, Gabos S, Xie L (2006): Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. *Toxicol In Vitro* 20, 995–1004
- Xing JZ, Zhu L, Jackson JA, Gabos S, Sun XJ, Wang XB, Xu X (2005): Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors. *Chem Res Toxicol* 18, 154–161
- Xintaropoulou C, Ward C, Wise A, Marston H, Turnbull A, Langdon SP (2015): A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. *Oncotarget* 6, 25677–25695
- Yalcin A, Clem BF, Simmons A, Lane A, Nelson K, Clem AL, Brock E, Siow D, Wattenberg B, Telang S et al. (2009a): Nuclear Targeting of 6-Phosphofructo-2-kinase

-
- (PFKFB3) Increases Proliferation via Cyclin-dependent Kinases*. *J Biol Chem* 284, 24223–24232
- Yalcin A, Telang S, Clem B, Chesney J (2009b): Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol* 86, 174–179
- Yao Y, Xu X, Yang L, Zhu J, Wan J, Shen L, Xia F, Fu G, Deng Y, Pan M et al. (2020): Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell stem cell* 26
- Yeh JJ, Kim WY (2015): Targeting tumor hypoxia with hypoxia-activated prodrugs. *J Clin Oncol* 33, 1505–1508
- Zhang J, Xue W, Xu K, Yi L, Guo Y, Xie T, Tong H, Zhou B, Wang S, Li Q et al. (2020): Dual inhibition of PFKFB3 and VEGF normalizes tumor vasculature, reduces lactate production, and improves chemotherapy in glioblastoma: insights from protein expression profiling and MRI. *Theranostics* 10, 7245–7259
- Zong WX, Rabinowitz JD, White E (2016): Mitochondria and Cancer. *Molecular Cell* 61, 667–676

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Ghadimi für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation in seiner Klinik bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Dr. Lena-Christin Conradi für die Aufnahme in Ihre AG und Bereitstellung der interessanten Promotionsthematik. Vielen Dank für die dauerhafte kompetente Betreuung, anregenden Diskussionen und freundliche Hilfe und Unterstützung. Regelmäßige Gespräche und Labormeeetings haben mich positiv beeinflusst und ermutigt.

Im Gleichen möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Dr. Tiago De Oliveira für die engagierte wissenschaftliche Betreuung und Einführung in den Laboralltag, für die permanente Erreichbarkeit, die immer anhaltende Unterstützung und motivierenden Worte bedanken. Ohne seine Hilfe wäre die Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht zustande gekommen.

Weiterhin bedanke ich mich bei dem kompletten Laborteam der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie. Insbesondere bei Birgit Jünemann für die Unterstützung in der Anfertigung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen und ihre ständige Hilfsbereitschaft. Die tägliche Zusammenarbeit mit Dr. Melanie Spitzner, Jessica Eggert, Johanna Buschalsky und Chang-Ron Lai war stets geprägt von einer freundlichen und hilfsbereiten Atmosphäre sowie wertvollen Diskussionen.

Hervorheben möchte ich zudem die Unterstützung des Teams der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie. Besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Rieken für die wertvollen fachlichen Hinweise und Anregungen. Auch bei Juliane Kasten-Krapp und Alexandra Bitter bedanke ich mich für die Einführung in die Handhabung des Bestrahlungssystems und für die umfassende Unterstützung während der Experimente.

Für die statistische Analyse der xCELLigence-Versuche bedanke ich mich bei Karly Conrads und Prof. Dr. Tim Reißbarth.