

# **Untersuchungen zur Regulation des Hyaluronsäuresystems in Ösophaguskarzinomzellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sören Twarock

aus Köln

Dezember 2007

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J.W. Fischer

Koreferent: Prof. Dr. S. Lärer

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Januar 2008

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Hyaluronsäure.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Struktur und Funktion .....	1
1.1.2	Hyaluronsäuresynthasen (HAS) und Hyaluronidasen (HYAL).....	3
1.1.3	Der membranständige Hyaluronsäurerezeptor CD44 .....	4
1.1.4	Der intra- und extrazelluläre Hyaluronsäurerezeptor RHAMM.....	4
1.1.5	Mit einer pathologischen Veränderung des Hyaluronsäuresystems assoziierte Erkrankungen .....	6
1.1.6	Hyaluronsäure in der Karzinogenese .....	7
1.2	<b>Der Hyaluronsäureinhibitor 4-Methylumbelliferon .....</b>	<b>11</b>
1.2.1	Struktur und Vorkommen.....	11
1.2.2	Wirkungsmechanismus.....	12
1.2.3	Geschichte des 4-Methylumbelliferons als Hyaluronsäureinhibitor und seine Anwendung in der Karzinogeneseforschung.....	13
1.2.4	Wirksamkeit und Sicherheit .....	15
1.3	<b>Das Ösophaguskarzinom.....</b>	<b>16</b>
1.3.1	Definition.....	16
1.3.2	Ätiologie .....	16
1.3.3	Epidemiologie .....	16
1.3.4	Prognose .....	17
1.3.5	Therapie.....	17
1.4	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1	<b>Substanzen.....</b>	<b>20</b>
2.2	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>21</b>
2.3	<b>Antikörper.....</b>	<b>23</b>
2.4	<b>Geräte und Material .....</b>	<b>26</b>
2.5	<b>Zellkultur.....</b>	<b>27</b>
2.6	<b>Proteinbestimmung .....</b>	<b>28</b>
2.7	<b>Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration mit einem ELISA-ähnlichen Versuchsaufbau .....</b>	<b>28</b>
2.8	<b>Messung der DNA-Neusynthese mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation zur Bestimmung der proliferativen Aktivität.....</b>	<b>28</b>
2.9	<b>Bestimmung der migratorischen Aktivität mittels eines modifizierten Boyden-Kammer-Versuches .....</b>	<b>29</b>
2.10	<b>Immunoblot-Analyse .....</b>	<b>30</b>
2.11	<b>Immunzytochemische Färbungen.....</b>	<b>31</b>
2.12	<b>Auswertung immunozytochemischer Färbungen.....</b>	<b>32</b>
2.13	<b>Größenausschlusschromatographie .....</b>	<b>33</b>
2.14	<b>Programmierung eines Säulenchromatographie-Steuerungsprogramms .....</b>	<b>34</b>
2.15	<b>Bestimmung der sulfatierten Glykosaminoglykane im Medium.....</b>	<b>35</b>
2.16	<b>Lentivirale Ausschaltung der HAS2- und HAS3- mRNA- Expression .....</b>	<b>36</b>
2.16.1	Beschreibung des lentiviralen Systems .....	36
2.16.2	Vermehrung der Plasmide.....	38

2.16.3	Produktion der Lentiviren .....	38
2.16.4	Infektion der Zielzellen .....	38
2.16.5	Validierung der Gen-Ausschaltung .....	39
2.16.6	Untersuchungen des Phänotyps nach Gen-Ausschaltung .....	40
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>41</b>
3.1	<b>Einfluss von 4-MU auf die Hyaluronsäuresynthese und Morphologie von OSC1-Zellen</b> .....	<b>41</b>
3.2	<b>4-MU vermittelte Veränderungen der proliferativen und migratorischen Aktivität von OSC1-Zellen</b> .....	<b>45</b>
3.3	<b>Veränderungen der fokalen Adhäsionen, des Zytoskeletts und des Hyaluronsäurerezeptors CD44 unter 4-MU-Behandlung</b> .....	<b>46</b>
3.4	<b>Calpain-abhängige Verminderung von FAK und phospho-FAK</b> .....	<b>48</b>
3.5	<b>Einfluss von Inhibitoren verschiedener Signaltrans-duktionswege auf den Phänotyp von OSC1</b> .....	<b>52</b>
3.6	<b>Einfluss anderer Hyaluronsäure-„Antagonisten“ auf die FAK-Degradation</b> ..	<b>53</b>
3.7	<b>OSC1-Zellen wiesen Hyaluronsäure-assozierte Zellfortsätze auf, die unter Einfluss von 4-MU zerstört wurden</b> .....	<b>55</b>
3.8	<b>Die beobachteten Zellfortsätze sind protrusiv, enthalten Aktinfasern und fokale Adhäsions-Komplexe, aber kein Tubulin</b> .....	<b>59</b>
3.9	<b>Lentivirale Ausschaltung der Genexpression von HAS3</b> .....	<b>64</b>
3.10	<b>Invasives Potential der Zellfortsätze</b> .....	<b>66</b>
3.11	<b>Ähnliche Zellfortsätze in anderen Arten von Krebszellen</b> .....	<b>68</b>
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>69</b>
4.1	<b>Die Verankerung der Zelle im Gewebe</b> .....	<b>71</b>
4.2	<b>Der fokale Adhäsionskomplex</b> .....	<b>74</b>
4.2.1	Integrine, Kontaktstellen zur Extrazellulärmatrix .....	76
4.2.2	Die fokale Adhäsionskinase (FAK), ein zentrales Molekül in der integrin-vermittelten Signaltransduktion .....	79
4.3	<b>Mögliche Mechanismen der 4-MU induzierten FAK-Degradation</b> .....	<b>82</b>
4.3.1	Abhängigkeit der Integrin-vermittelten Adhäsion von der Hyaluronsäure-vermittelten Adhäsion.....	82
4.3.2	Möglicher Einfluß der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM auf die Degradierung von FAK .....	84
4.4	<b>Calpain-Abhängigkeit der FAK-Degradation</b> .....	<b>85</b>
4.5	<b>Auswirkungen der FAK-Degradation auf die Zellmorphologie und MMP9</b> .....	<b>87</b>
4.6	<b>FAK-unabhängige Wirkung von 4-MU auf die ERK-Aktivität</b> .....	<b>88</b>
4.7	<b>Die verschiedenen Hemmstoffe der Hyaluronsäure-Wirkungen und ihre Effekte auf FAK-Degradation und Zellmorphologie - Zusammenfassung</b> .....	<b>90</b>
4.8	<b>Auf Aktin basierende Strukturen</b> .....	<b>93</b>
4.9	<b>Struktur und mögliche Funktion der beobachteten Zellfortsätze</b> .....	<b>96</b>
4.9.1	Struktur .....	96
4.9.2	Mögliche Funktion der Filopodien.....	98
4.10	<b>Mechanismen der 4-MU induzierten Rückbildung der Zellfortsätze</b> .....	<b>99</b>

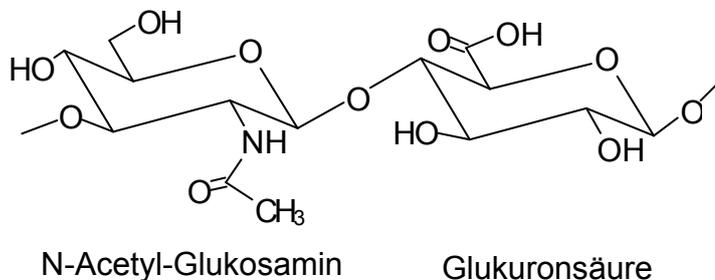
4.11	Ausblick .....	100
4.12	Fazit.....	101
5	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>102</b>
6	<b>Summary.....</b>	<b>103</b>
7	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
8	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
9	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>115</b>
9.1	Kongressbeiträge .....	115
9.2	Fachzeitschriften .....	115
10	<b>Danksagung .....</b>	<b>116</b>
11	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>117</b>
12	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>118</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hyaluronsäure

### 1.1.1 Struktur und Funktion

Hyaluronsäure besteht aus Disaccharideinheiten aus N-Azetyl-Glukosamin und Glukuronsäure, die  $\beta(1-4)$  bzw.  $\beta(1-3)$  verknüpft vorliegen (**Abbildung 1-1**). Es handelt sich um ein unverzweigtes Polysaccharid, welches in einer sehr breiten Größendistribution auftritt, die von wenigen Disaccharid-Einheiten bis zu mehr als



**Abbildung 1-1** Hyaluronsäure besteht aus bis zu  $10^5$  alternierenden Einheiten N-Azetyl-Glukosamin und Glukuronsäure, die  $\beta(1-4)$  bzw.  $\beta(1-3)$  verknüpft sind und sich nicht verzweigen.

$10^5$  Disacchariden, entsprechend  $10^7$  Dalton Molekulargewicht, reicht<sup>2</sup>. Im Gegensatz zu den anderen Glykosaminoglykanen wie Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat, Keratansulfat und Heparin, die alle sulfatiert vorliegen, wird Hyaluronsäure nicht im endoplasmatischen Retikulum bzw. dem Golgi-Apparat produziert. Vielmehr wird sie von drei membranständigen Isoenzymen der Hyaluronsäuresynthase (HAS 1-3) aus den beiden oben genannten Bestandteilen synthetisiert<sup>3</sup>. Es ist noch nicht abschliessend untersucht, ob die entstehenden Hyaluronsäureketten im gleichen Schritt von den HAS-Enzymen in den Extrazellulärraum extrudiert<sup>3</sup> oder über einen ABC-Transporter in den Extrazellulärraum transportiert<sup>4</sup> werden. Hyaluronsäure ist neben Kollagen ein Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix und erfüllt eine Reihe wichtiger Funktionen, die sich grob in mechanische und biochemische bzw. zellbiologische Aufgaben unterteilen lassen:

Die mechanischen Funktionen der Hyaluronsäure stehen in direktem Zusammenhang mit ihrer ausgeprägten Wasseraufnahmefähigkeit, die durch die vielen negativen Ladungen dieses Moleküls zustande kommt, und dem daraus resultierenden Quellvermögen. So besteht das Innere des Augapfels aus 98 % Wasser, das an 2 % Hyaluronsäure gebunden vorliegt<sup>5</sup>. Hyaluronsäure sorgt nicht nur für eine starke Hydratisierung des Gewebes, sondern erfüllt aufgrund der Tatsache, dass das eingelagerte Wasser nicht komprimierbar ist, auch eine stützende Funktion. Diesen strukturgebenden Effekt kann man nicht nur im Binde- und Stützgewebe finden, sondern auch sehr eindrucksvoll in den *Nuclei pulposi*, den Gallertkernen der Bandscheiben. Eine weitere wichtige lokale Akkumulation von Hyaluronsäure findet sich schließlich in der *Synovia*, der Gelenkflüssigkeit. Interessant sind hier die thixotropen Eigenschaften der Hyaluronsäure<sup>6</sup>. Diese äußern sich dadurch, dass die Viskosität mit steigender Bewegung, d.h. zunehmenden Scherkräften abnimmt. Somit wird das Gelenk in Ruhe gestützt, bleibt aber bei schnellen Bewegungen flexibel. Als weitere mechanische Eigenschaft sei noch die Funktion der Hyaluronsäure in der Zellwanderung erwähnt. Hier wird durch vermehrte Hyaluronsäureproduktion ein Raum im Zellverband eröffnet, in den sich die migrierende Zelle hineinbewegen kann. Diesen Mechanismus benutzen in verstärktem Maße auch Krebszellen<sup>7,8</sup> (siehe unter 1.1.6).

Einen besonders wichtigen Aspekt, der erst in den letzten Jahrzehnten wachsende Aufmerksamkeit gefunden hat, stellen die biochemischen und zellbiologischen Funktionen der Hyaluronsäure dar. In diesem Zusammenhang sind vor allem die mannigfaltigen Wechselwirkungen der Hyaluronsäure mit anderen Matrixbestandteilen zu nennen. So bindet Hyaluronsäure an eine Reihe von Proteoglykanen wie die Hyalektane Aggrecan oder Versican oder an Hyaladherine wie TSG-6 (*Tumor Nekrose Faktor stimuliertes Gen 6*) und Ial (*Inter- $\alpha$ -Trypsin-Inhibitor*) und hilft dadurch eine stark vernetzte perizelluläre Hyaluronsäurematrix auszubilden<sup>9</sup>. Der zweite Aspekt der zellbiologischen Aktivität der Hyaluronsäure bezieht sich auf die spezifischen Ligand-Rezeptor-Interaktionen mit den in der Regel membranständigen Hyaluronsäurerezeptoren. Zwei der wichtigsten Rezeptoren sind CD44 und RHAMM (Rezeptor für Hyaluronsäure medierte Motilität, CD168)<sup>10,11</sup> (siehe 1.1.3 und 1.1.4).

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die Funktion der Hyaluronsäure in der Signalvermittlung zwischen einzelnen Zellen untereinander bzw. im Falle eines Tumors, zwischen der Krebszelle und den Stromazellen dar. So hängt es in bedeutendem Maße vor allem von der Größe der synthetisierten Hyaluronsäure ab, welche Funktion sie ausübt<sup>2</sup>. In diesem Zusammenhang vermitteln kleine Hyaluronsäurefragmente in der Größenordnung von wenigen Disacchariden immunogene, inflammatorische und migrationsfördernde Prozesse<sup>12-16</sup>, während größere Moleküle, darunter ein 20 kDa großes Fragment als ein wichtiger Stimulus der Angiogenese identifiziert wurden<sup>17-20</sup>. Hochmolekulare Hyaluronsäure im Bereich zwischen  $10^5$  und  $10^7$  Dalton hingegen unterdrückt Angiogenese<sup>21</sup> und erfüllt immunsuppressive Funktionen<sup>22,23</sup>, ist aber möglicherweise auch an Prozessen wie Migration und Proliferation beteiligt<sup>24</sup>.

### **1.1.2 Hyaluronsäuresynthasen (HAS) und Hyaluronidasen (HYAL)**

Die verschiedenen HAS-Isoenzyme (HAS1-3) produzieren Hyaluronsäureketten, die sich vor allem in der Polymergröße unterscheiden: Während HAS1 und HAS2 Hyaluronsäure in einer Größenordnung von  $10^6$  bis  $10^7$  Dalton produzieren, synthetisiert HAS3 Moleküle mit einem Molekulargewicht von ca.  $10^5$  Dalton<sup>3</sup>. Vor allem die kleineren, hochaktiven Hyaluronsäurefragmente entstehen nicht direkt bei der Synthese, sondern sind die Produkte der hyaluronsäureabbauenden Enzyme, den Hyaluronidasen (HYAL1-3)<sup>25,26</sup>. HYAL1 und HYAL2 arbeiten dabei in einer Kaskade zusammen, wobei membranständige HYAL2 Hyaluronsäure bindet, internalisiert und auf ein 20 kDa großes Fragment herunterspaltet. Dieses wird dann in die Lysosomen transportiert und dort von HYAL1 bis auf eine Größe von wenigen Disacchariden abgebaut<sup>25</sup>. Für HYAL3 sind bisher noch keine spezifischen Funktionen bekannt. Da vor allem durch die Arbeit der Hyaluronidasen die bereits beschriebenen, hochaktiven Hyaluronsäurefragmente entstehen, ist es nicht verwunderlich, dass diese häufig im Verlauf der Tumorzellprogression heraufreguliert werden<sup>25,27,28</sup>.

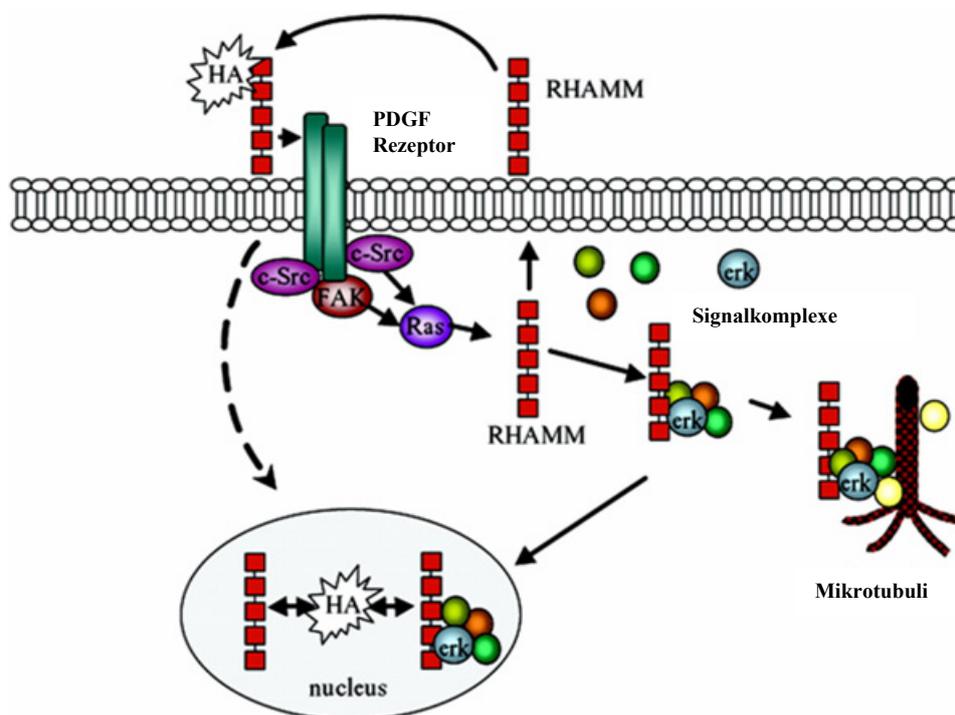
### **1.1.3 Der membranständige Hyaluronsäurerezeptor CD44**

CD44, der erste Oberflächen-Hyaluronsäurerezeptor, der entdeckt wurde, besitzt eine weite Verbreitung auf u.a. hämatopoetischen Stammzellen, Fibroblasten und Tumorzellen<sup>29</sup>. CD44 erfüllt verschiedenartige Aufgaben in der Lymphozyten-Aktivierung und -Bewegung, der Hämatopoese, der Zell-Aggregation und Zytokin-Ausschüttung. In der Tumorgenese vermittelt CD44 vor allem Metastasierung und Anheftung<sup>30-34</sup>. CD44 kommt in einer Vielzahl von Isoformen vor, von denen einige gewebe- und zellspezifisch exprimiert werden<sup>35</sup>. Die häufigste Isoform besteht aus einem 37 kDa großen Kernprotein, das nachträglich extensiv N- und O-glykosyliert wird und so schließlich ein Molekulargewicht von 85-95 kDa erreicht. Diese weit verbreitete Form wird CD44s (s=Standard) genannt und enthält keine variablen Exons. Die durch Spleißen zustande kommenden Formen werden CD44v (v=Variante) genannt und werden zell-, zellzyklus- und erkrankungsspezifisch exprimiert<sup>36-38</sup>. CD44 bindet neben Hyaluronsäure auch andere Liganden wie Osteopontin, Kollagen und Matrixmetalloproteinasen (MMP)<sup>39</sup>. Der wichtigste nachgeschaltete Signaltransduktionsweg wird über die Phosphoinosid-3-Kinase (PI3K) vermittelt und führt letztlich zu einer Proteinkinase B (AKT) - Phosphorylierung. Diese steuert die Vorgänge der Apoptose, der Adhäsion und der Migration<sup>40</sup>.

### **1.1.4 Der intra- und extrazelluläre Hyaluronsäurerezeptor RHAMM**

RHAMM wurde als zweiter Hyaluronsäure-Rezeptor entdeckt und ist sowohl in der Zellmembran als auch im Zytoplasma lokalisiert<sup>41</sup>. RHAMM reguliert die Zellmotilität<sup>42</sup> und den Umsatz der fokalen Adhäsionen<sup>43</sup>. Dies erklärt seine transformierende Wirkung bei Überexpression<sup>43-45</sup>. RHAMM kommt in fast allen Zelltypen vor<sup>46,47</sup>. In ruhenden Zellen ist die Expression von RHAMM eher gering; diese wird aber nach Zytokin-Stimulation und in transformierten Zellen stark aufreguliert<sup>47,48</sup>. Wie CD44, kommt RHAMM in mindestens sechs Spleißvarianten vor, von denen in nicht transformiertem Gewebe ein 70 kDa großes Protein (RHAMM1) vorherrschend ist, während in transformiertem Gewebe die 73 kDa Variante RHAMM1v4 in den Vordergrund tritt<sup>41,45</sup>. RHAMM führt nach einer

Stimulation der Zellen mit Hyaluronsäure zu einer Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) (siehe 4.2.2) und zu einem gesteigerten Umsatz der gesamten fokalen Adhäsionskomplexe<sup>43</sup> (siehe 4.2). Hall *et al.*<sup>45</sup> und Zang *et al.*<sup>49</sup> beschreiben eine Signalkaskade, in der zwischen der Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) durch das Protoonkogen Ras ein regulierendes RHAMM steht (**Abbildung 1-2**). Dabei führt eine Überexpression oder Stimulierung von RHAMM durch Hyaluronsäure zu einer Verstärkung dieses Weges. Umgekehrt konnte durch eine dominant-negative Mutante von RHAMM eine Reversibilität des Ras-transformierten Phänotyps beobachtet werden<sup>45</sup>. Die Signaltransduktion des membranständigen RHAMM-Rezeptors ist noch nicht zur Gänze verstanden. Wahrscheinlich assoziiert RHAMM mit dem PDGF (*Platelet derived Growth Factor*)-Rezeptor, der über Src und FAK eine Ras-Induktion verursacht, die die zuvor beschriebene, RHAMM-regulierte, ERK-Phosphorylierung auslöst (**Abbildung 1-2**).



**Abbildung 1-2** Die RHAMM-Rezeptor-regulierte Signaltransduktion. Bei Aktivierung durch Hyaluronsäure bindet der RHAMM-Rezeptor an den PDGF-Rezeptor. Dieser aktiviert über Src und FAK das Ras-Protein. Ras phosphoryliert seinerseits ERK. Diese Aktivierung wird wieder durch RHAMM kontrolliert. Aktiviertes ERK bindet schließlich an Mikrotubuli und transloziert in den Kern. Modifiziert nach Turley, *Signaling Properties of Hyaluronan Receptors*, JBC, 2002, Vol. 277, Nr. 7, pp. 4589-4592.

### **1.1.5 Mit einer pathologischen Veränderung des Hyaluronsäuresystems assoziierte Erkrankungen**

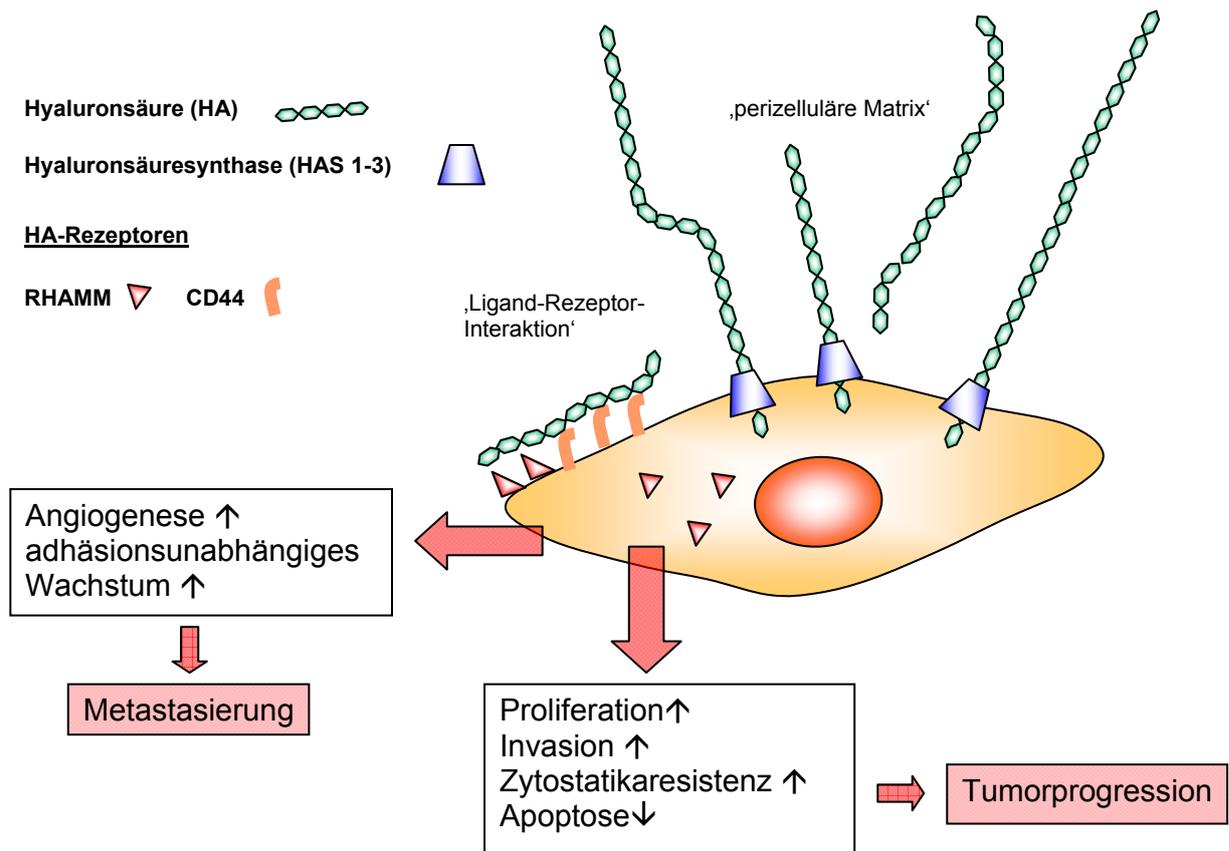
Pathologische Veränderungen in hyaluronsäureabhängigen Prozessen finden sich bei einer Reihe bedeutender Krankheitsbilder.

*In vitro* Daten deuten darauf hin, dass in der Pathogenese der Atherosklerose eine starke Stimulation der Hyaluronsäuresynthasen HAS1 und HAS2 durch von Makrophagen freigesetztes Prostaglandin E<sub>2</sub> zu einer vermehrten Anreicherung von Hyaluronsäure im perizellulären Raum führt, was eine Migration glatter Gefäßmuskelzellen in die atherosklerotische Plaque bewirken kann<sup>50</sup>. Die Bedeutung eines weiteren HAS-Isoenzym (HAS3) in der konkomitierenden Inflammation ist Gegenstand aktueller Forschung. Ein durch Hyaluronsäurefragmente unterhaltenes Entzündungsgeschehen findet sich auch bei pathologischen Veränderungen in anderen Bereichen des Körpers wie z.B. bei der Gingivitis oder Parodontitis<sup>51</sup>.

Ein weiteres klassisches Gebiet der Hyaluronsäureforschung beschäftigt sich mit der Hautalterung und den damit verbundenen Dehydratations- und Degenerationsprozessen in den verschiedenen Schichten der Haut<sup>52</sup>. Auch in der Gelenkdegeneration ist die Verarmung der *Synovia* (für die Bedeutung der Hyaluronsäure in der *Synovia* siehe 1.1.1) an Hyaluronsäure ein pathophysiologischer Schlüsselprozess. Die Hyaluronsäure fungiert hier als eine Art „Gelenkschmiere“, so dass das Fehlen von Hyaluronsäure im Alter die typische Ursache einer Osteoarthrose, nämlich eine Erosion des ebenfalls aus Hyaluronsäure bestehenden Knorpels, darstellt. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Umbildung des knorpelnahe Knochens, einhergehend mit Schmerzen, Schwellungen, Bewegungseinschränkung und Deformierung der Gelenke. Hinzu könnte in diesem Geschehen der vermehrte Abbau der hochmolekularen Hyaluronsäure durch Hyaluronidasen zu den bereits erwähnten proinflammatorischen nur aus wenigen Disacchariden aufgebauten Hyaluronsäurefragmenten kommen, die über die Auslösung einer Arthritis zu einer zusätzlichen Exazerbation des Grundgeschehens führen würden.

### 1.1.6 Hyaluronsäure in der Karzinogenese

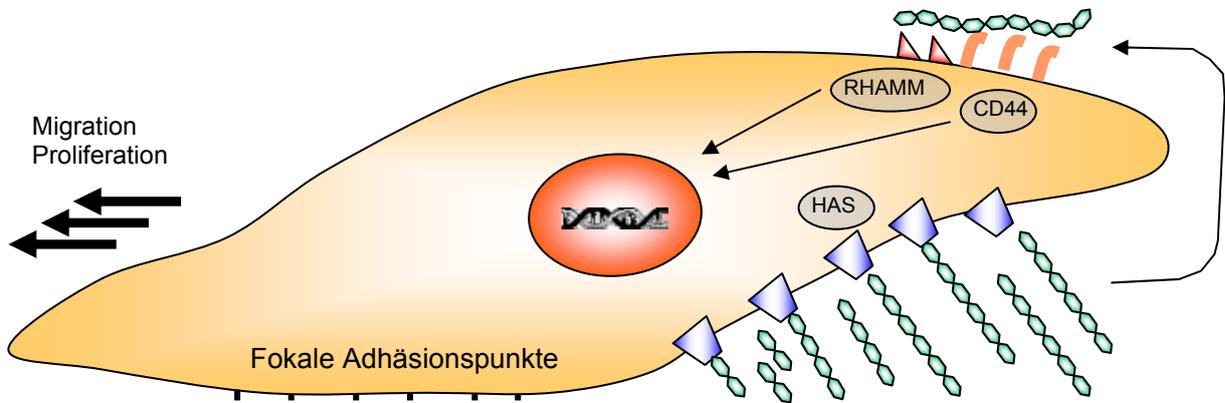
Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Tumorgenese, einem weiteren sehr bedeutenden Feld der Hyaluronsäureforschung. In diesem Bereich erfüllt die Hyaluronsäure eine Vielfalt an Funktionen, die im Folgenden beschrieben werden (**Abbildung 1-3**):



**Abbildung 1-3** Die Bedeutung der Hyaluronsäure in der Tumorgenese, unterteilt nach progressions- und metastasierungsfördernden Eigenschaften.

Als Grundlage für jede Zellbewegung und -teilung bietet eine vermehrte Hyaluronsäureproduktion der Tumorzelle eine wichtige Möglichkeit, die Migration zu steigern und die Invasion in Fremdgewebe zu forcieren<sup>7,8,16</sup>. Dabei produziert die Zelle, nach einer Sondierung der Wanderungsrichtung unter Zuhilfenahme verschiedener Zellfortsätze wie Filopodien, *Mikrospikes* oder Mikrovilli<sup>53</sup>, in einem ersten Schritt vermehrt Hyaluronsäure, um in ihrer direkten Umgebung eine leichter zu durchdringende Matrix zu etablieren<sup>7,8</sup>. In einem zweiten Schritt extrudiert die Zelle

gerichtet Hyaluronsäure, um sich vom Substrat abzulösen. (**Abbildung 1-4**, zum Vorgang der Migration siehe Kapitel 4.8).



**Abbildung 1-4** Hyaluronsäure-vermittelte Wanderung einer Tumorzelle. In Wanderungsrichtung bilden sich fokale Adhäsionskomplexe, während sie auf der gegenüberliegenden Seite degradiert werden. Die Zelle nutzt Hyaluronsäure einerseits, um sich den Weg zu bahnen und andererseits, um sich abzulösen. Gleichzeitig stimuliert die abgegebene Hyaluronsäure die Hyaluronsäurerezeptoren RHAMM und CD44, die ihrerseits zu einer verstärkten Migration führen.

Ein weiterer von der Tumorzelle genutzter Mechanismus ist die Einhüllung in einen Hyaluronsäuremantel, der zweierlei Aufgaben erfüllen kann:

Einerseits bietet er der Tumorzelle einen Schutz vor exogen zugeführten Noxen wie Chemotherapeutika, indem er eine wirkungsvolle Diffusionsbarriere für eine Vielzahl von Molekülen darstellt. So wird in der klassischen Chemotherapie bereits seit langer Zeit Hyaluronidase eingesetzt, um diesen Hyaluronsäuremantel zu verdauen und so die Chemotherapieresistenz zu verringern<sup>54</sup>.

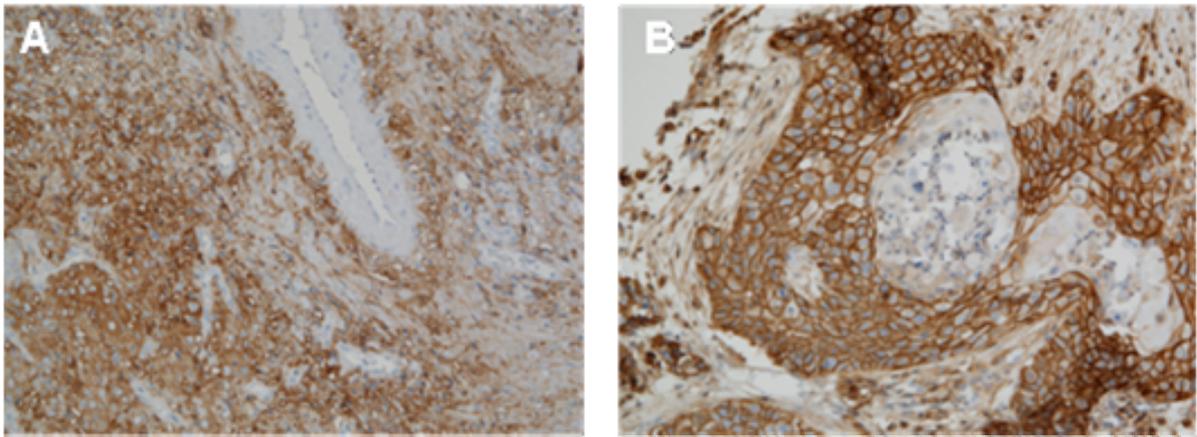
Andererseits wird auf diese Weise der jeder Zelle eigene Mechanismus des Anoikis, d.h. die durch Kontaktverlust zur Extrazellulärmatrix des umliegenden Gewebes ausgelöste Apoptose, unterbrochen. Hierbei stimuliert der verstärkte Hyaluronsäuremantel den membranständigen Hyaluronsäurerezeptor CD44. Dieser vermag durch den nachgeschalteten Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) – Proteinkinase B (AKT) Signalweg die nachlassenden Integrin-vermittelten Signale der fokalen Adhäsionskomplexe auszugleichen, wodurch eine ablösungsbedingte Apoptose verhindert wird<sup>33, 34</sup>. Die Folge ist eine Metastasierung der Tumorzelle über die vorher durch Angiogenese gebildeten Blutgefäße.

Weitere wichtige Aspekte betreffen die gesteuerte Beeinflussung der direkten Tumorumgebung: So beeinflusst eine Tumorzelle die nicht neoplastisch veränderten Umgebungszellen (Stroma-Zellen) durch verschiedene Stimuli:

Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang die Hyaluronsäure-abbauenden Enzyme HYAL1-3. Sie generieren auf die bereits beschriebene Weise (siehe unter 1.1.2) die besonders aktiven niedermolekularen Hyaluronsäuremoleküle, die hier z.B. zu einer Suppression der Apoptose, einer vermehrten Transkription von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), einer Stimulation der Tumor-Neovaskularisierung, einer Förderung der Angiogenese durch Stimulation von Endothelzellen und zu einer Begünstigung der Tumorzellmigration führen<sup>2, 25</sup>. Unter diesen Prozessen stellt besonders die Hyaluronsäure-vermittelte Angiogenese einen weiteren Schlüsselmechanismus auf dem Weg zur Malignität der Krebszelle dar.

Ein anderer Stimulus entsteht durch Ausnutzung des so genannten Warburg-Effekts (die aerobe Glykolyse), den fast alle Tumorarten aufweisen und der zu einer starken Produktion von Laktat durch das Karzinom führt. Das entstehende Laktat fungiert als ein Stimulus der Hyaluronsäuresynthese und veranlasst die Stroma-Zellen, für den wachsenden Tumor Hyaluronsäure als Matrix zur Verfügung zu stellen. Die gebildete Hyaluronsäurematrix fördert dann wieder die Tumorgenese<sup>55-57</sup>.

In einer Vielzahl an Tumorzellen und Tumorzelllinien lässt sich eine starke Hyaluronsäureproduktion gepaart mit einer starken Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 feststellen<sup>7,58-61</sup>. Dies trifft auch auf die hier untersuchten ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen zu, wie in immunhistochemischen Färbungen aus menschlichem Gewebe zu erkennen ist (**Abbildung 1-5**).



**Abbildung 1-5** Immunhistochemische Färbung von menschlichem ösophagealen Tumorgewebe. (A) Färbung auf Hyaluronsäure (braun), (B) Färbung des Hyaluronsäurerezeptors CD44 (braun). Sarbia et al., unveröffentlichte Korrespondenz.

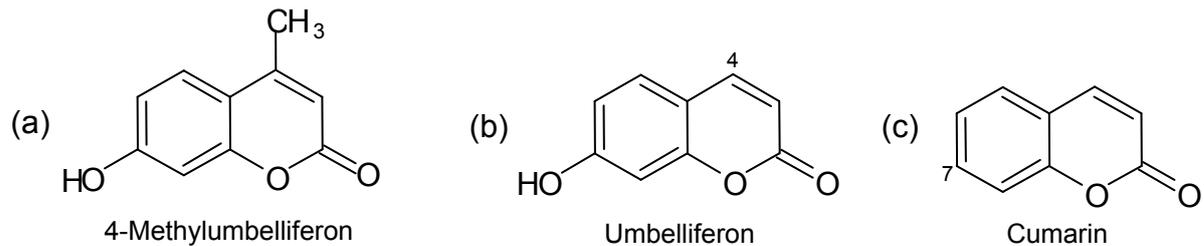
Durch viele Publikationen ist belegt, dass es unter einer Inhibition der Hyaluronsäureproduktion oder einer Blockade des Hyaluronsäurerezeptors CD44 zu einer signifikanten Reduktion des invasiven Zellwachstums von Tumorzellen kommt<sup>7,8,33,34,58,62,63</sup>. Dies lässt einerseits auf die Bedeutung der Hyaluronsäure für den malignen Phänotyp, aber auch auf eine gute Beeinflussbarkeit dieses Systems schließen.

Zusammenfassend stellt Hyaluronsäure eine wichtige Schaltstelle in der Tumorgenese dar. Daher ist offensichtlich, dass eine gerichtete Beeinflussung der beschriebenen Prozesse zu einem potenten therapeutischen Ansatz führen könnte.

## 1.2 Der Hyaluronsäureinhibitor 4-Methylumbelliferon

### 1.2.1 Struktur und Vorkommen

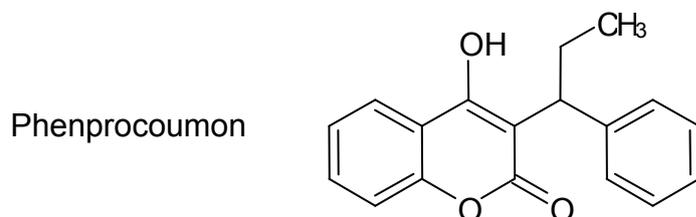
4-Methylumbelliferon (4-MU) ist ein an der Position 4 methyliertes Umbelliferon (**Abbildung 1-6 a, b**).



**Abbildung 1-6** Formeln von (a) 4-Methylumbelliferon und seinen Vorstufen (b) Umbelliferon und (c) Coumarin.

Umbelliferon findet sich als ubiquitär auftretender Inhaltsstoff in unserer heimischen Flora, so z.B. in *Angelica archangelica*, *Matricaria recutita*, *Daphne mezereum*, *Levisticum officinale* u.v.a mit auffälliger Häufung in der Familie der Apiaceae, die früher aufgrund ihrer Blütenstände Umbelliferen genannt wurden und so die Namensgeber dieser Verbindung darstellen.

Umbelliferon seinerseits wird durch eine Hydroxylierung an Position 7 des Coumarin-Grundgerüsts gebildet (**Abbildung 1-6 b, c**). Coumarin findet in seiner an Position 4 hydroxylierten Form mit weiteren Substituenten an Position 3 z.B. in Form von Phenprocoumon Verwendung als blutgerinnungshemmendes Arzneimittel (**Abbildung 1-7**).

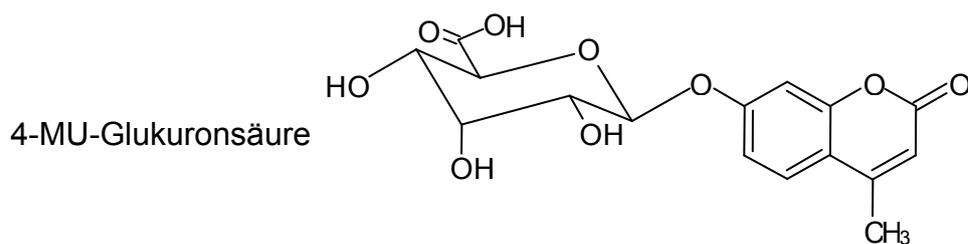


**Abbildung 1-7** Blutgerinnungshemmendes Coumarin-Derivat Phenprocoumon (Marcumar®).

Als Bestandteil vieler Pflanzen wird Umbelliferon selbst höchstens eine adjuvante Wirkung zugeschrieben. Bemerkenswert ist dabei die Tatsache, dass weder Cumarin noch Umbelliferon eine hemmende Wirkung auf das Hyaluronsäuresystem ausüben<sup>64</sup>.

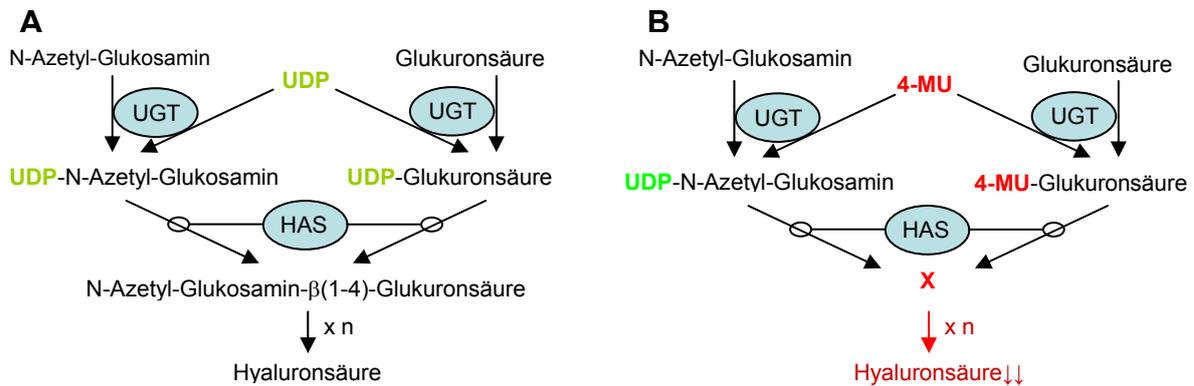
### 1.2.2 Wirkungsmechanismus

4-MU ist ein selektiver, kompetitiver Inhibitor der Hyaluronsäuresynthese. Hyaluronsäure wird von den drei Hyaluronsäuresynthase-Isoenzymen HAS 1, 2 und 3 aus den Vorstufen UDP-N-Azetylglukosamin und UDP-Glukuronsäure synthetisiert. Die Aktivierung von N-Azetylglukosamin und Glukuronsäure findet über eine UDP-Glukuryltransferase (UGT) statt. 4-MU wird von dieser statt Uridindiphosphat (UDP) mit Glukuronsäure zu 4-MU-Glukuronsäure verknüpft (**Abbildung 1-8**).



**Abbildung 1-8** An Stelle des physiologischen Metaboliten UDP-Glukuronsäure wird 4-MU-Glukuronsäure gebildet. Dies führt zu einer Depletion von UDP-Glukuronsäure und in der Folge zu einer Verminderung der Hyaluronsäuresynthese.

Dadurch verarmt die Zelle an aktivierter UDP-Glukuronsäure, was zu einer verminderten Hyaluronsäureproduktion führt<sup>65</sup> (**Abbildung 1-9**).



**Abbildung 1-9** Mechanismus der Hyaluronsäuresynthese (A) und dessen Hemmung durch 4-MU (B). Die UDP-Glukuryltransferase (UGT) addiert ein aktivierendes Uridindiphosphat (UDP) an N-Azetyl-Glukosamin und Glukuronsäure. Im Anschluss werden diese von der Hyaluronsäuresynthase (HAS) zu Hyaluronsäure verknüpft. 4-MU wird an Stelle von UDP mit Glukuronsäure verknüpft. Es resultiert eine Inhibition der Hyaluronsäuresynthese.

Analog diesem Mechanismus hemmen hohe Konzentrationen an D-Mannose, wenn auch weniger selektiv, die Bildung von UDP-N-Azetylglukosamin (Tammi, nicht publizierte Konferenzkorrespondenz).

### 1.2.3 Geschichte des 4-Methylumbelliferons als Hyaluronsäureinhibitor und seine Anwendung in der Karzinogeneseforschung

Erste Versuche, die einen Effekt von 4-MU auf die Hyaluronsäuresynthese von humanen Hautfibroblasten zeigten, wurden im Jahr 1995 durch Nakamura *et al.* unternommen<sup>66</sup>. Diese zeigten bereits, dass 4-MU den hochmolekularen Anteil an in das Medium abgegebener Hyaluronsäure stärker verringert, als den Anteil mittlerer Größe. Konzentrations-Wirkungsbestimmungen in dieser Arbeit zeigen eine maximale Hemmung der Hyaluronsäuresynthese unter dem Einfluss von 0,5 mM 4-MU. Des Weiteren wurde festgestellt, dass 4-MU keinen Einfluss auf Galaktosaminoglykane (Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat) hat. 1997 wies dieselbe Arbeitsgruppe nach, dass 4-MU die Hyaluronsäure direkt am Enzym inhibiert und dafür keine weiteren Zellkompartimente gebraucht werden<sup>67</sup>. Kakizaki *et al.* zeigten 2002 anhand der Hyaluronsäuresynthese von *Streptococcus equi*, dass sich in Bezug auf das Hyaluronsäuresynthase-Enzym weder mRNA, noch

Proteinlevel änderten. Zusätzlich wird für *Streptococcus equi* als Wirkungsmechanismus eine Veränderung in der Membranlipidzusammensetzung v.a. des Cardiolipins vorgeschlagen<sup>68</sup>. Ebenfalls 2002 zeigten Nakamura *et al.*<sup>69</sup> eine Induktion der Genexpression von MMP-1 und der Aktivität von MMP-2 durch 4-MU. Diese sind höchstwahrscheinlich sekundärer Natur und eine Folge der Matrixveränderungen unter Hyaluronsäuredepletion.

Seit der Entdeckung des Wirkungsmechanismus durch Kakizaki *et al.*<sup>65</sup> im Jahre 2004 erfährt 4-MU eine wachsende internationale Aufmerksamkeit im Feld der Extrazellulärmatrixforschung. In dieser Veröffentlichung wird UDP-Glukuronsäure, eine Vorstufe der Hyaluronsäuresynthese (siehe 1.2.2) als die Zielstruktur der Wirkung von 4-MU nachgewiesen. Unter einer Zugabe dieser Vorstufe ist der Effekt von 4-MU auf die Hyaluronsäuresynthese vollständig reversibel, was eine kompetitive Substrat-Hemmung durch 4-MU anzeigt. Noch im selben Jahr und in den Folgejahren wurde 4-MU von verschiedenen Autoren in Zellkulturversuchen eingesetzt. So zeigten Kudo *et al.*, dass 4-MU die Adhäsion und Bewegung von Tumorzellen senkt<sup>62</sup>. Rilla *et al.* berichteten ebenfalls 2004 über den Einsatz von 4-MU zur Eindämmung einer Keratinozyten-Aktivierung und einer epidermalen Hyperproliferation. Ein erste Veröffentlichung *in vivo* kam 2005 von Yoshihara *et al.*, die eine Akkumulation von 4-MU in der Leber von Nacktmäusen feststellten und deshalb dessen Einfluss auf Lebermetastasen untersuchten<sup>70</sup>. Bei einer Behandlung der Mäuse mit 4-MU konnten sie eine Abnahme von Lebermetastasen um 30 % und bei einer Vorbehandlung der Zellen um 50 % berichten. Als Chemotherapie-Adjuvans eingesetzt, führt 4-MU zu erhöhten Ansprechraten von humanen Pankreaskrebszellen<sup>71</sup>. Wahrscheinlich kommen hier die unter 1.1.6 beschriebenen Mechanismen der Auflösung des Hyaluronsäuremantels und der Verminderung des CD44 vermittelten PI3K-AKT Signalweges zum Tragen, wie sie bereits früher unter einer Hyaluronidase-Behandlung genutzt wurden<sup>54</sup>. Morohashi *et al.* überprüften 2006 die Wirkung von strukturellen Variationen des 4-MU-Grundgerüsts und fanden nur zwei Derivate mit einer geringfügig stärkeren Wirkung auf die Hyaluronsäureproduktion. Diese unterscheiden sich von 4-MU dahingehend, dass sie eine zweite Hydroxy-Gruppe in Position 5 oder 6 tragen. 6-Hydroxy-4-Methylumbelliferon wird auch 4-Methylesculetin (=4-ME) genannt. Wie von Tofuku *et*

*al.* gefunden wurde, hemmte 4-MU die HAS3-vermittelte Proliferation und Invasion von Osteosarkoma-Zellen<sup>72</sup>. Erst kürzlich untersuchten Hajime *et al.* den Einfluss von 4-ME auf das Tumorwachstum in immundefizienten Nacktmäusen und wiesen eine starke Senkung der Tumorphiliferation nach<sup>73</sup>. Die aktuellste Veröffentlichung zu 4-MU beschreibt eine Abnahme der MMP-9-Expression in Krebszellen<sup>74</sup>. Diese wird unter 4.5 diskutiert.

### **1.2.4 Wirksamkeit und Sicherheit**

4-MU ist seit langer Zeit in Deutschland mit der INN Bezeichnung Hymecromon unter den Handelsnamen Cholospamin<sup>®</sup> forte und Chol-Spasmolekten<sup>®</sup> zur symptomatischen Behandlung von Gallenwegsspasmen zugelassen. Die Wirksamkeit gegen Gallenwegsspasmen beruht auf einer Ausnutzung der papaverinartigen Wirkung von 4-MU. Die übliche Tagesdosis beträgt bei dieser Anwendung 1200 mg oral per dies. Selbst in hohen Dosen sind keine schwerwiegenden Nebenwirkungen bekannt geworden. Dieser Sachverhalt spricht für eine gute Verträglichkeit der hier untersuchten Substanz, die durch ihren Status als zugelassenes Arzneimittel bereits sämtliche zulassungsrelevanten Hürden wie toxikologische Prüfungen und Unbedenklichkeits-Untersuchungen passiert hat<sup>75</sup>. Einer klinischen Erprobung am Menschen als Tumorthapeutikum steht somit nichts im Wege. Die vorliegende Arbeit soll in diesem Zusammenhang Grundlagenforschung im Bereich der pharmakologisch induzierten Hyaluronsäuredepletion leisten, damit eine eventuelle künftige Pharmakotherapie vor dem Hintergrund eines eindeutig geklärten Wirkungsmechanismus ablaufen kann.

## **1.3 Das Ösophaguskarzinom**

### **1.3.1 Definition**

Die Entität des Ösophaguskarzinoms stellt eine maligne Neoplasie der Speiseröhre dar, die sich histologisch in Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome unterteilen lässt. Dabei handelt es sich heute in 50-60 % der Fälle um Plattenepithelkarzinome, die besonders im mittleren, weniger im oberen Ösophagusdrittel auftreten (Verhältnis ca. 1:3-4). 40-50 % der Ösophaguskarzinome treten als Adenokarzinome in Erscheinung, welche vor allem im unteren Ösophagusdrittel zu finden sind<sup>76</sup>.

### **1.3.2 Ätiologie**

Zu den Risikofaktoren speziell für das Plattenepithelkarzinom zählen Nikotin- und Alkoholabusus sowie eine obst- und gemüsearme Ernährung. Die Risikofaktoren für ein Adenokarzinom umfassen vor allem eine Refluxerkrankung sowie Übergewicht und männliches Geschlecht<sup>77</sup>. Eine präkanzeröse Vorstufe eines Adenokarzinoms stellt der Barrett-Ösophagus dar. Dieser wird durch eine persistierende Säureeinwirkung im Rahmen der Refluxerkrankung ausgelöst und entsteht durch einen metaplastischen Umbau von Plattenepithel zu Zylinderepithel, im unteren, zur Kardia des Magens hin gelegenen Teil des Ösophagus. Ein wichtiger, die Malignität bestimmender Faktor im Verlauf der Karzinogenese ist die Eindringtiefe des Karzinoms in die Speiseröhrenwand. Sie korreliert direkt mit der lymphogenen Metastasierungshäufigkeit, einem wichtigen prognostischen Parameter<sup>77</sup>.

### **1.3.3 Epidemiologie**

Das Ösophaguskarzinom ist durch eine in den letzten 15 Jahren stetig ansteigende Zahl an Neuerkrankungen bei fast gleich bleibend schlechter Prognose

gekennzeichnet. Es handelt sich dabei international um die achthäufigste Tumorerkrankung, die in Europa und den USA mit einer Inzidenz von etwa 4-6 Fällen / 100.000 Einwohner und Jahr auftritt<sup>78</sup>. Weltweit zeigt sich eine besonders starke Häufung in China (ca. 130 Fälle / 100.000 per annum), dem Iran, Süd- und Ostafrika und Nordfrankreich<sup>79, 80, 81</sup>. Obwohl das Plattenepithelkarzinom nach wie vor die dominierende Form darstellt, ist die Inzidenz des Adenokarzinoms in den letzten 15 Jahren in der westlichen Welt auf ein Vierfaches angestiegen. Männer sind häufiger als Frauen betroffen (Geschlechterverhältnis etwa 4:1) und Schwarze öfter als Kaukasier (Verhältnis ca. 2:1). Der Altersgipfel liegt zwischen dem 65. und dem 70. Lebensjahr<sup>78</sup>.

### **1.3.4 Prognose**

Das Ösophaguskarzinom hat eine insgesamt ungünstige Prognose. Die 5-Jahres-Überlebensrate konnte seit den 1970er Jahren im Vergleich zu den späten 1990er Jahren nur von 5 % auf 13 % angehoben werden<sup>82</sup>. Eine Resektion mit kurativer Intention gelingt nur in 30 % der Fälle; die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt dann 10 - 25 %<sup>76</sup>. Der Vergleich zwischen der Inzidenz maligner Neoplasien der Speiseröhre und der Mortalität der betroffenen Patienten in den USA und Europa zeigt, dass 90 – 95 % der Patienten schließlich auch an dieser Erkrankung sterben<sup>80,83</sup>. Die mittlere Überlebensrate liegt bei 9 Monaten ab Diagnosestellung, bei Lymphknotenmetastasierung beträgt sie 6 Monate<sup>82,84</sup>. Die ungünstige Prognose ergibt sich aus der schnellen Metastasierung dieser Tumorform und der Symptomarmut der frühen Krankheitsstadien.

### **1.3.5 Therapie**

Die chirurgische Intervention, entweder in Form einer lokal ablativen Technik oder einer Resektion, ist heute immer noch, trotz erheblicher peri- und postoperativer Komplikationen und geringer Langzeitüberlebenschancen, die Therapie der Wahl<sup>77</sup>. Zusätzlich kommen multimodale Therapieansätze, in denen die chirurgische Intervention mit Chemo- und Radiotherapien kombiniert wird, zum Einsatz. Hingegen

kommt der alleinigen adjuvanten Radiotherapie oder Chemotherapie aufgrund ungenügender Wirksamkeit keine Bedeutung zu. Nur eine Kombination aus beiden scheint eine sinnvolle, wenn auch moderat wirksame, zusätzliche Behandlungsoption zu sein<sup>77</sup>. Ein großes Problem stellt die schon erwähnte rasche Metastasierung bei geringem Symptomaufkommen dar. In diesem Zusammenhang wäre eine medikamentöse Therapie, deren pharmakologischer Ansatzpunkt auch die metastasierenden Zellen einschließt, ein großer Fortschritt für die Therapierbarkeit des Ösophaguskarzinoms<sup>77</sup>.

## 1.4 Zielsetzung

Die Umgebung von Tumorzellen weist eine Anreicherung der extrazellulären Matrix mit Hyaluronsäure (HA) auf, die für eine Vielzahl von Malignitätsfaktoren wie Metastasierung, Invasion und Chemotherapieresistenz verantwortlich ist<sup>7</sup>. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem konstitutiv aktiven Hyaluronsäuresystem in der Ösophaguskarzinomzelllinie OSC1 und dessen pharmakologischer Beeinflussbarkeit. Stellvertretend für andere Tumorarten werden die Auswirkungen des Hyaluronsäureinhibitors 4-Methylumbelliferon (4-MU) erforscht. Dabei steht die Frage im Vordergrund, ob es gelingt, durch eine pharmakologische Therapie das Hyaluronsäuresystem der Tumorzelle dergestalt zu beeinflussen, dass eine Ausbreitung des Tumors *in vivo* verhindert oder aufgehalten werden kann. Eine ösophageale Tumorlinie wurde ausgewählt, da diese Tumorentität durch ein besonders aggressives Erscheinungsbild geprägt ist, was mit einer schlechten Prognose und nur unzureichender Behandelbarkeit durch konservative Methoden wie operative Eingriffe, Bestrahlung oder Chemotherapie einhergeht<sup>77</sup>.

In diesem Zusammenhang sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Parameter einer Behandlung von OSC1-Zellen mit 4-MU untersucht werden:

1. Welchen Einfluss hat eine Inhibition der Hyaluronsäuresynthese auf die Zellmorphologie?
2. Welche Mechanismen liegen diesen morphologischen Veränderungen zugrunde?
3. Welche funktionellen Auswirkungen haben diese Veränderungen auf OSC1-Zellen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Substanzen

*Tabelle 2-1* Verwendete Substanzen und Komplettpakete

<b>Substanzen</b>	<b>Hersteller</b>
[ <sup>3</sup> H]-Glukosaminhydrochlorid	Hartmann Analytic, Braunschweig
4-Methyl-Umbelliferon	Sigma-Aldrich, München
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 40 %	BioRad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Calcein-AM	Sigma-Aldrich, München
Calpain-Inhibitor MDL28170	Sigma-Aldrich, München
DMEM (Dulbeccos' Modified Eagle Medium) Zellkulturmedium	Gibco–Invitrogen, Karlsruhe
ECL Advanced Blocking Reagenz	GE-Healthcare Europe, München
ECL plus Detection Reagent	GE-Healthcare Europe, München
ERK-Inhibitor U0126	Sigma-Aldrich, München
Hoechst 33324	Sigma-Aldrich, München
Image-iT <sup>®</sup> LIVE Plasma Membran Marker	Invitrogen, Karlsruhe
Latrunculin A	Sigma-Aldrich, München
EndoFree Plamid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
[methyl- <sup>3</sup> H]-Thymidin	Hartmann Analytics, Braunschweig
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Protein-Standard)	Fermentas, St.Leon-Rot
PEP-1	Biosynthan, Berlin
PI3-Kinase-Inhibitor LY294002	Sigma-Aldrich, München
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Pronase	Sigma-Aldrich, München
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich, München
Proteinkinase-C-Inhibitor Bisindolylmaleimid I	Sigma-Aldrich, München

Rho-Kinase-Inhibitor HA1077	Sigma-Aldrich, München
Rotiszint® Eco plus	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 (Rosswell Park Memorial Institute) Zellkulturmedium	Sigma-Aldrich, München
Sephacryl S-1000	GE-Healthcare Europe, München
Sephadex G50	Sigma-Aldrich, München
Streptomyces Hyaluronidase	MP Biomedicals, Frankreich
SuperScript™ III First Strand cDNA Synthesis Kit	Gibco–Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green® PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Tri-Reagent®	Sigma-Aldrich, München
Vectashield® Antifade Mounting Medium	Vector Laboratories, CA, USA
Vitrogen 100	Collagen Corp, Palo Alto, CA, USA

## 2.2 Puffer und Lösungen

*Tabelle 2-2: Verwendete Puffer und Lösungen in der immunzytochemischen Färbung*

<b>Puffer bzw. Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>1 x PBS</b>	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4
<b>Blockierungs-Puffer</b>	1x PBS 3 % (w/v) BSA (Bovines Serumalbumin)
<b>Permeabilisierungs-Puffer</b>	Blockierungs-Puffer 0,3 % (v/v) Triton X-100

**Tabelle 2-3** Verwendete Puffer und Lösungen in der Protein-Analyse

<b>Puffer bzw. Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
<b>10 x Laufpuffer</b>	250 mM Tris (Trishydromethylaminomethan) 1,9 mM Glycin 1 % SDS	
<b>1 x Lysispuffer</b>	1 % SDS 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) 10 mM Tris pH 7,4	
<b>2 x Auftragspuffer</b>	125 mM Tris pH 6,8 4 % SDS 10% Glyzerol 0,006 % Bromophenol Blau 100 mM DTT	
<b>Sammelgel (5%)</b>	0,5 M Tris pH 6,8	0,625 ml
	10 % SDS	50 µl
	dH <sub>2</sub> O	3,895 ml
	40% Acrylamid / Bis-acrylamid 37.5:1	375 µl
	TEMED	5 µl
	APS 10 % - 0,1 g/ml	50 µl
<b>Trenngel (10%)</b>	3 M Tris pH 8,7	0,975 ml
	10 % SDS	75 µl
	dH <sub>2</sub> O	4,545 ml
	40 % Acrylamid / Bis-acrylamid 37,5:1	1,875 ml
	TEMED	5 µl
	APS 10 % - 0,1 g/ml	25 µl
<b>Blockierlösung</b>	2 % (w/v) <i>ECL Advanced Blocking Reagenz</i> in 1x TBST	
<b>1x Transfer-Puffer</b>	1 x Laufpuffer 20 % Methanol 0,01% SDS	

<b>10 x TBS</b>	<b>100 mM Tris / HCl</b> <b>1,5 mM NaCl</b> <b>pH 7,4</b>
<b>1x TBST</b>	1 x TBS 0,1 % Tween 20

**Tabelle 2-4** *Verwendete Puffer und Lösungen in der Hyaluronsäuregrößenbestimmung*

Gelquellungspuffer für G50 Säule	0,1 M Trisazetat 0,02 % NaN <sub>3</sub> pH 7,3
Elutionspuffer G50	Gelquellungspuffer 0,025 % CHAPS (3-[(3-Cholamido-propyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
Elutionspuffer S-1000	0,5 M Natriumazetat 0,02 % NaN <sub>3</sub> 0,025 % CHAPS pH 7

## 2.3 Antikörper

**Tabelle 2-5** *Im Immunoblot verwendete Antikörper*

<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
rabbit anti-beta-Aktin	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
rabbit anti-Akt	Cell Signaling Danvers, MA, USA	1:500
rabbit anti-phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Danvers, MA, USA	1:500
mouse anti-CD44H	R&D Systems, Wiesbaden	1:500
rabbit anti-ERK	Cell Signaling Danvers, MA, USA	1:500

<b>rabbit anti-phospho-ERK</b>	<b>Cell Signaling Danvers, MA, USA</b>	<b>1:500</b>
mouse anti-FAK	BD Transduction Lab, Heidelberg	1:500
rabbit anti-phospho-FAK (Y397)	Santa Cruz, Heidelberg	1:500
rabbit anti-FAK (A-17) (C-20) sc-557, sc-558 (Degradation)	Santa Cruz, Heidelberg	1:200
mouse anti-beta-Tubulin Typ I	Sigma-Aldrich, München	1:10000

*Tabelle 2-6 In der Immunocytochemischen Färbungen verwendete Antikörper*

<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
mouse anti-CD44H	R&D Systems, Wiesbaden	1:500
mouse anti-FAK	BD Transduction Lab, Heidelberg	1:200
rabbit anti-phospho-FAK (Y397)	Santa Cruz, Heidelberg	1:200
Hyaluronsäurebindeprotein, biotinyliert	Seikagaku, Tokyo, Japan	2 µg / ml
Hermes-1 (blockierend für CD44)	Endogen, Pierce Biotechnology, Rockford, USA	40 µg / ml
dodo anti-Marmelade	Xylophon Inc, Viersen	1:1000
mouse anti-Paxillin	BD Transduction Lab, Heidelberg	1:500
Phalloidin-FITC	Sigma-Aldrich, München	1:1000
mouse anti-beta-Tubulin Typ I	Sigma-Aldrich, München	1:1000
rabbit anti-phospho-Tyrosin (pTyr 100)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:500

**Tabelle 2-7** Im Immunoblot verwendete Sekundärantikörper

<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz, Heidelberg	1:4000
goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz, Heidelberg	1:4000

**Tabelle 2-8** In der Immunzytochemie verwendete Sekundärantikörper

<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-mouse IgG F(ab') <sub>2</sub> Frag. Cy3-konjugiert	Sigma-Aldrich, München	1:600
anti-mouse IgG FITC- konjugiert	Santa Cruz, Heidelberg	1:400
anti-rabbit IgG F(ab') <sub>2</sub> Frag. Cy3-konjugiert	Sigma-Aldrich, München	1:600
anti-rabbit FITC-konjugiert	Jackson Immuno- Research, Suffolk, UK	1:500
Streptavidin, Cy3-konjugiert	Caltag Laboratories, Invitrogen, Karlsruhe	1:500
Streptavidin, FITC-konjugiert	DAKO, Hamburg	1:200

## 2.4 Geräte und Material

*Tabelle 2-9 Verwendete Geräte und Material*

<b>Elektrophoresekammer (Protein)</b>	<b>Mini-PROTEAN<sup>®</sup>3 Electrophoresis Cell, PowerPac 200 + 300 Power Supply</b>	<b>BioRad, München</b>
Filmauswertung (Scanner und Software)	GS-800 Calibrated Densitometer Quantity One <sup>®</sup> Version 4.4.1	Umax Systems GmbH, Willich BioRad, München
Gefriertrocknung	Gefriertrocknungsanlage Beta I	Christ, Osterode am Harz
Fluoreszenz-Mikroskop inkl. Kamera und Software	Olympus BX 50, IX 50 Colorview II Kamera mit Soft Imaging System-Software	Olympus, Hamburg Soft Imaging System, Münster
Fluoreszenz-Mikroskop inkl. Kamera und Software	Nikon Eclipse TE-2000 PFS NIS-Elements Software	Nikon, Badhoevedorp, Niederlande
Konfokales Mikroskop	Zeiss LSM510	Zeiss, Oberkochen
Protein-Transfer (Western-Blot)	PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter	Peqlab, Erlangen
RNA, DNA-Messung	Nanodrop-1000	Peqlab, Erlangen
PCR-Gerät	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Realtime-PCR-Gerät	Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Fluoreszenzimager	Taiphon 8600 Imager	GE Healthcare Europe, München
Szintillationszähler	LS6000IC	BeckmanCoulter, Krefeld
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R (kühlbar)	Eppendorf, Hamburg

Chromatographiepumpe	HiLoad Pump P-50	GE-Healthcare Europe, München
Fraktionssammler	Frac-100	GE-Healthcare Europe, München
Chromatographiesäule	Tricorn 300/10	GE-Healthcare Europe, München
Blot-Papier	Whatman-Papier	Schleicher und Schuell, Maidstone, England
Blot-Membran	PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Migrationsmembran	Polycarbonat-Membran mit 10 µm Poren	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA)

## 2.5 Zellkultur

Die humane Ösophaguskarzinomzelllinie OSC1 wurde von Sarbia *et al.* isoliert und erstmals beschrieben<sup>85</sup>. Die in den Invasionsversuchen verwendete Fibroblasten-Zelllinie CRL-1635 sowie die Tumorzelllinien ACC China, BLM und Hep G2 stammen von der ATCC (American Type Culture Collection vertrieben von LGC Promochem, Wesel). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen als Monoschicht-Kulturen in RPMI-1640-Medium (Sigma-Aldrich, München) mit Zusatz von 2 mM Glutamin (Gibco, Karlsruhe), 1000 U / ml Penicillin G (Gibco, Karlsruhe), 1000 µg / ml Streptomycin (Gibco, Karlsruhe) und 10 % FCS (Fötales Kälberserum, Gibco, Karlsruhe) bei 37°C in einer 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre gehalten. Die Zellen wurden bei Erreichen einer 90%igen Konfluenz passagiert und zwischen den Passagen 16 und 30 für Experimente eingesetzt. Grundsätzlich erfolgten alle Experimente in Vollmedium. Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Behandlung mit 0,3 mM 4-MU 24 Stunden nach Aussaat für weitere 24 Stunden. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 % eingesetzt.

## **2.6 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung der in den Versuchskammern befindlichen Zellen erfolgte mit Hilfe eines Bradford-Reagenz' (Biorad). Die Probe wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und mit dem Reagenz (1:5 in Wasser) vermischt. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe herangezogen. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 595 nm.

## **2.7 Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration mit einem ELISA-ähnlichen Versuchsaufbau**

Die Aussaat der Zellen erfolgte bei einer Dichte von  $10^5$  Zellen pro Kammer einer 6-Loch-Kulturplatte. Nach einer 24-stündigen Wachstumszeit wurden die Zellen weitere 24 Stunden mit  $300 \mu\text{M}$  4-MU (in DMSO, Lösungsmittelkontrolle äquivalent) inkubiert. In das Medium abgegebene Hyaluronsäure wurde analog den Herstelleranweisungen (Corgenix, Colorado, USA) bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte wie unter 2.6 beschrieben. Die gemessene Hyaluronsäuremenge wurde auf die Protein-Menge in Mikrogramm bezogen.

## **2.8 Messung der DNA-Neusynthese mittels [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Inkorporation zur Bestimmung der proliferativen Aktivität**

Die Aussaat der Zellen erfolgte bei einer Dichte von  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro Kammer einer 24-Loch-Kulturplatte in Dreifach-Bestimmung. Nach einem Serum-Entzug über Nacht wurden die Zellen für 24 Stunden mit 10 % FCS stimuliert und zusätzlich mit  $0,3 \text{ mM}$  4-MU oder Lösungsmittel behandelt. Während der letzten sechs Stunden wurde  $1 \mu\text{Ci} / \text{ml}$  Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin (Hartmann Analytics, Braunschweig) zu den Zellen gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen nacheinander mit PBS und  $0,1 \text{ M}$  Perchlorsäure gewaschen und mit  $0,1 \text{ M}$  NaOH lysiert. Der Proteingehalt im Lysat wurde, wie unter 2.6 beschrieben, bestimmt. Das Lysat wurde in einem LS6000IC Szintillationszähler (BeckmanCoulter, Krefeld) gemessen, um den Anteil des in die DNA eingebauten radioaktiven Tritiums zu bestimmen. Das Ergebnis wurde in *cpm* (Radioaktive Ereignisse pro Minute) pro Mikrogramm ( $\mu\text{g}$ ) Protein angegeben.

## **2.9 Bestimmung der migratorischen Aktivität mittels eines modifizierten Boyden-Kammer-Versuches**

Mit 4-MU vorbehandelte Zellen und Kontrollzellen wurden in einer Dichte von  $10^3$  Zellen pro Loch in Medium ohne Serum in Sechsergruppen auf die Oberseite einer mit monomerem, aufgereinigtem Kollagen (Vitrogen 100, Collagen Corp, Palo Alto, CA, USA) beschichteten Polycarbonat-Membran mit 10 Mikrometer Poren (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA) in einer modifizierten Boyden-Kammer aufgebracht. Medium mit Serum wurde in die untere Kammer appliziert. Die Zellen wurden für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die nicht gewanderten Zellen von der Oberseite entfernt und die durch die Membran migrierten Zellen auf der Unterseite mit Methanol fixiert. Darauf wurde die Membran mit 5  $\mu\text{g}$  / ml Propidiumjodid in PBS gefärbt und dreimal in PBS gewaschen. Die Detektion fand auf einem Taiphon 8600 Imager (GE Healthcare Europe, München) bei einer Exzitationswellenlänge von 532 nm und einer Detektionswellenlänge von 580 nm statt. Die quantitative Auswertung erfolgte über eine Messung der Intensität der gefärbten Punkte.

## 2.10 Immunoblot-Analyse

Die behandelten Zellen wurden mit PBS gewaschen und in Lyse-Puffer geerntet. Nach Ultraschallbehandlung wurden die Proben für fünf Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Die Proteinbestimmung erfolgte wie unter 2.6 beschrieben. Danach wurden die Lysate mit 2 x Auftragspuffer vermischt und zur Denaturierung für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Protein-Lysate wurden über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Dabei wurden 20 µg Gesamtprotein jeder Probe pro Spur eines Polyacrylamid-Gels (5%iges Sammelgel, 10%iges Trenngel) aufgeladen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichts-Marker (*Prestained Protein Ladder*, 10-180 kDa, Fermentas, St. Leon-Roth) auf das Gel aufgebracht. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V. Im Anschluss wurden die aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel mit einer *Semi-Dry*-Apparatur auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad) bei 15 V für eine weitere Stunde transferiert. Die Membran wurde in *ECL Advance Blocking Solution* für eine Stunde blockiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die primären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200-1:500 in Blockierlösung eingesetzt, die sekundären HRP-gekoppelten anti-Maus oder anti-Kaninchen Antikörper wurden 1:4000 mit Blockierlösung verdünnt. Die Membran wurde mit beiden Antikörpern jeweils für eine Stunde inkubiert und zwischen den Inkubationsperioden drei Mal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Daraufhin folgte eine Behandlung mit dem ECL plus™ Detektionssystem (GE Healthcare Europe, München) für 5 Minuten. Die entstehende Chemilumineszenz wurde durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL™, GE Healthcare Europe, München) visualisiert. Um eine gleichmäßige Proteinbeladung zu garantieren, wurden die detektierten Banden auf das Signal eines nicht regulierten, konstitutiv exprimierten *housekeeping* Gens normiert. Sofern möglich, wurden Erst-Antikörper verschiedener Spezies verwendet, um beide Signale gleichzeitig auf einem Film detektieren zu können.

## 2.11 Immunzytochemische Färbungen

Die Zellen wurden auf einem 20 mm Deckgläschen ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Danach wurden sie für weitere 24 Stunden mit 300  $\mu$ M 4-MU bzw. Lösungsmittelkontrolle behandelt und nach Ablauf der Inkubationszeit entweder mit 3,7 % Paraformaldehyd (zur weiteren Detektion mit anti-CD44, anti-pFAK, anti-FAK, HAbP oder pTyr100) oder mit einer Azeton-/Methanol-Mischung im Verhältnis 1:1 bei  $-20^{\circ}\text{C}$  (Phalloidin-FITC) für 20 Minuten fixiert. Darauf wurden die Zellen 5 Minuten mit Permeabilisierungspuffer (0,3 % Triton X-100, 3 % BSA in PBS) inkubiert und anschließend eine Stunde in 3 % BSA in PBS blockiert.

Die Primärantikörper wurden in Verdünnungen zwischen 1:100-1:500 in Blockierungslösung für eine Stunde eingesetzt. Die nachgewiesenen Epitope umfassten: die fokale Adhäsionskinase (FAK) und deren phosphorylierte Form (pFAK) sowie Paxillin; beides sind Bestandteile des fokalen Adhäsionskomplexes, an dem auch Integrin beteiligt ist. Des Weiteren kamen HAbP, ein Hyaluronsäurebindeprotein, zum Nachweis von Hyaluronsäure, der Phosphotyrosin-Antikörper pTyr 100 und ein Antikörper gegen den Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 zum Einsatz. Eine Ausnahme stellte die Inkubation mit Phalloidin-FITC (Sigma, München), zum Nachweis von Aktin, und dem *Image-IT<sup>®</sup> LIVE Plasma Membran Marker* (Invitrogen, Karlsruhe), einem Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 konjugierten Weizenkeim-Agglutinin, dar. Diese bewirken eine direkte Anfärbung der relevanten Strukturen und wurden für eine Dauer von 20 Minuten eingesetzt.

Nach wiederholtem Waschen wurden die Präparate für eine Stunde mit chromophor-konjugierten Sekundärantikörpern in einer Verdünnung von 1:600 in PBS inkubiert. Abschließend wurden die Kerne mit Hoechst 33342 für eine Minute gegengefärbt und das Präparat mit *Vectashield Antifade Mounting Medium<sup>®</sup>* (Vector Laboratories, CA, USA) eingedeckt und mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

## 2.12 Auswertung immunozytochemischer Färbungen

Die Präparate wurden im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Eine mikroskopische Auswertung erfolgte entweder mit einem Nikon TE-2000 Fluoreszenzmikroskop mit gekühlter Graustufen-CCD-Kamera oder mit einem konfokalen LSM510 Laserfluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss. Zusammengehörige Präparate wurden stets mit der gleichen Belichtungszeit (TE-2000) bzw. den gleichen Laser- und Detektoreinstellungen (LSM510) aufgenommen. Die verwendeten Chromophore sind in **Tabelle 2-10** aufgeführt.

*Tabelle 2-10 In der Fluoreszenzmikroskopie verwendete Chromophore*

<b>Chromophor</b>	<b>Absorptionmaximum</b>	<b>Emissionsmaximum</b>	<b>verw. Exzitation</b>
Hoechst 33324	343 nm	483 nm	351 nm
FITC (Fluorescein- isothiocyanat)	495 nm	519 nm	488 nm
Cy3 (Carbocyanin 3)	550 nm, (512 nm)	570 nm, (615 nm)	543 nm

Eine Nachbearbeitung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte auf elektronischem Wege mit Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). Dabei wurden die einzeln im TIF-Dateiformat mit 24 Bit Farbtiefe vorliegenden Graustufenbilder der Fluoreszenzkanäle zuerst mittels einer festgelegten Tonwertkorrektur in den sichtbaren Sättigungsbereich transferiert und danach unter Zuhilfenahme eines programmierten Makros in eine Farbtiefe von 8 Bit und im Anschluss in den RGB-Farbraum umgewandelt. Die Übereinanderlagerung der drei Kanäle erfolgte über eine negative Multiplikation der Ebenen. Danach wurden die Ebenen gemeinsam im verlustfreien TIF-Format abgespeichert und das entstandene Bild ausgewertet.

## 2.13 Größenausschlusschromatographie

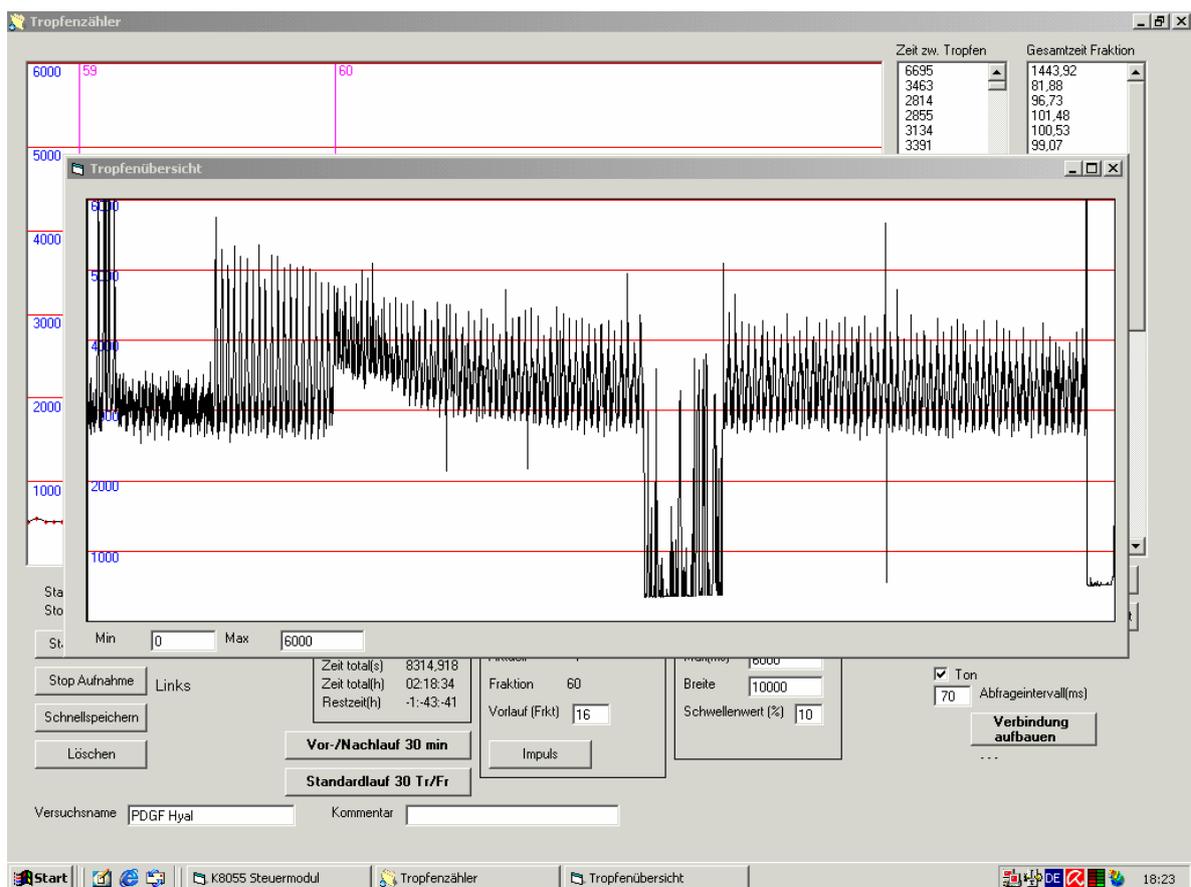
Die Zellen wurden bei einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Kammer in einer 6-Loch-Kulturplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 300  $\mu\text{M}$  4-MU oder Lösungsmittelkontrolle und 60  $\mu\text{Ci} / \text{ml}$  [ $^3\text{H}$ ]-Glukosaminhydrochlorid (Hartmann Analytics, Braunschweig) für weitere 24 Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und mit 500  $\mu\text{g} / \text{ml}$  Pronase bei 37 °C über Nacht inkubiert. Dadurch wurden bei der Größenaufftrennung störende, proteinvermittelte Verknüpfungen zwischen einzelnen Hyaluronsäureketten vermieden. Am darauf folgenden Tag erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Pronase durch fünfzehnminütiges Aufkochen der Proben.

Die Gesamt-Glykosaminoglykan-Fraktion wurde gewonnen, indem der verdaute Mediumüberstand über eine Sephadex G50-Größenausschluss-Vorsäule aufgereinigt wurde. Zur Rehydratisierung und Einstellung der adäquaten Porengröße wurde das Sephadex G50 Säulenmaterial für vier Stunden im Gelquellungspuffer (0,1 M Trisazetat, 0,02 %  $\text{NaN}_3$ , pH 7,3) equilibriert. Bei der Elution aus der Vorsäule wurden nur die Anteile der Probe mit einem Molekulargewicht über  $10^4$  Dalton eluiert. Der ungebundene Anteil an radioaktivem Glukosamin blieb ebenso in der Säule zurück wie sehr kleine Hyaluronsäurefragmente, die mit diesem Verfahren nicht untersucht werden können.

Nach Szintillationszählung in einem LS6000IC Szintillationszähler (BeckmanCoulter, Krefeld) wurde ein 20.000 *cpm* enthaltendes Aliquot mit und ohne einen vorherigen Hyaluronidaseverdau (10 U / ml für 24 h bei 37 °C) einer Größenaustausch-Chromatographie auf Sephacryl S-1000 Füllmaterial in einer 30x1 cm Tricorn-Säule (GE Healthcare Europe, München) unterworfen. Die Elution erfolgte mittels S-1000 Elutionspuffer (0,5 M Natriumazetat, 0,02 %  $\text{NaN}_3$ , 0,025 % CHAPS, pH 7). Hyaluronidase-empfindliche *cpm* wurden von *cpm* aus den entsprechenden unverdauten Proben abgezogen um ein Verteilungsprofil an Hyaluronsäuregrößen im Medium zu erhalten.

## 2.14 Programmierung eines Säulenchromatographie-Steuerungsprogramms

Zum Einsatz kam eine eigens für diese Applikation in der Programmiersprache Visual Basic 6.0 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) geschriebene Säulenchromatographie-Steuerungs-Software, die ein fortlaufendes Überwachen des Eluatflusses mittels eines proprietären Tropfenzählers auf Lichtschrankenbasis gewährte und den Fraktionssammler entsprechend steuerte. Diese Maßnahme wurde nötig, da im Zuge der Auftrennung hochmolekularer Hyaluronsäure auf der Chromatographiesäule eine nicht kalkulierbare Verzögerung des Eluatflusses auftrat, aufgrund dessen nicht die übliche zeitgesteuerte Fraktionsnahme erfolgen konnte. Eine solche Störung des Eluatflusses ist exemplarisch vor dem Hintergrund der Programmoberfläche in **Abbildung 2-1** dargestellt.



**Abbildung 2-1** Bildschirmfoto des Säulenchromatographie-Steuerungsprogramms. Der dargestellte Graph zeigt eine typische durch hochmolekulare Hyaluronsäure hervorgerufene Störung des Eluatflusses.

Die Zeit zwischen den Tropfen des die Chromatographiesäule verlassenden Eluats wurde erfasst und gegen die verstrichene Zeit aufgetragen. Als *Interface* zwischen Software und Hardware wurde der Digital / Analog Wandler Nr. 8055 der Firma Velleman, Gevere, Belgien eingesetzt. Über diesen wurden die Signale einer von der technischen Abteilung des Instituts für Pharmakologie konstruierten Lichtschranke auf LED-Basis verarbeitet. Über einen weiteren Ausgang wurde das „Nächste Probe“-Signal an den Fraktionssammler übermittelt und über eine Kontrollleitung dessen Status überwacht. Die Tropfzeiten des gesamten Laufes wurden im Anschluss überprüft und archiviert.

### **2.15 Bestimmung der sulfatierten Glykosaminoglykane im Medium**

Die Zellen wurden bei einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Kammer in einer 6-Loch-Kulturplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von 4-MU und  $10 \mu\text{Ci } ^{35}\text{SO}_4$  für weitere 24 Stunden inkubiert. 50  $\mu\text{l}$  Mediumüberstand wurde in Dubletten in  $3 \times 3$  cm große Quadrate auf einem Whatman-Papier aufgebracht und trockengefönt. Nach viermaligem zweistündigen Waschen mit einer einprozentigen Cetylpyridiniumchloridlösung, mit deren Hilfe die Glycosaminoglykane auf das Papier gefällt und andere Bestandteile entfernt werden, wurden die Quadrate ausgeschnitten, mit Rotiszint<sup>®</sup> Eco plus Szintillationslösung vermischt und die radioaktiven Ereignisse in cpm (*counts per minute*) gezählt. Die gemessenen cpm stehen für den Anteil an sulfatierten Glykosaminoglykanen im Medium.

## 2.16 Lentivirale Ausschaltung der HAS3-mRNA- Expression

### 2.16.1 Beschreibung des lentiviralen Systems

Die genetische Ausschaltung der Hyaluronsäuresynthasegene wurde mit Hilfe des MISSION™ *Lentiviral shRNA knockdown systems* (Sigma-Aldrich, München) durchgeführt.

Die Interferenz-RNA-Technik sorgt für eine effektive Depletion der Zelle an der mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) des Zielgens. Die lentivirale Produktion basierte auf einem Drei-Plasmid-System der dritten Generation. Ein Plasmid kodierte für das VSV-G (Vesikuläres Stomatitis Virus G-Protein)-Hüllprotein und ein Plasmid trug die aus Sicherheitsgründen verkürzten Stücke der HIV-1 (Humanes Immundefizienzvirus 1) Strukturproteine. Das dritte Plasmid (siehe **Abbildung 2-2**) enthielt eine shRNA-Sequenz, die gegen HAS3 gerichtet war. Das Ampicillin-Resistenz-Gen (*ampR*) ist nötig, um den Vektor über eine Selektion in *E. coli* zu vervielfältigen, die Puromycin-Resistenz (*puroR*) dient zur Selektion der infizierten Zielzellen. Nur die Sequenz zwischen den beiden *Long Terminal Repeats* (LTRs) wird bei einer Infektion der Zielzelle in die DNA (Desoxyribonukleinsäure) des Wirtes integriert. Da sich hier keine für den Aufbau der Lentiviren wichtigen Gene befinden, ist sicher gestellt, dass keine vermehrungsfähigen Lentiviren von den Zielzellen produziert werden. Das Verpackungssignal Psi sorgt schließlich dafür, dass die DNA in die in der Produktionszelllinie entstehenden Lentiviren verpackt wird.



### **2.16.2 Vermehrung der Plasmide**

Die Vermehrung der Plasmide erfolgte unter Ausnutzung des Ampicillin-Resistenz-Gens, welches eine selektive Amplifikation in *E. coli* Bakterien erlaubt. Die Aufreinigung der Gesamt-DNA erfolgte durch einen EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen, Hilden. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 260 nm mit dem Nanodrop-1000-Photometer (Peqlab, Erlangen).

### **2.16.3 Produktion der Lentiviren**

Der Transfer in die Produktionszelllinie HEK 293T (ATCC) wurde mittels des Lipofektions-Reagenzes Fugene 6 (Roche, Mannheim) durchgeführt. Nach 16 Stunden wurde das normale Wachstumsmedium (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) gegen HEPES-gepuffertes Spezialmedium (IMDM, *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) getauscht, um eine bessere Stabilität der Lentiviren zu erreichen. Alle Schritte erfolgten unter Benutzung von hitzeinaktiviertem FCS, um die entstehenden Viren nicht einem aktiven Komplementssystem auszusetzen. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und mit Zentrifugation unter Zugabe von Poly-L-Lysin aufkonzentriert. Dies fand unter den von Zhang *et al.*<sup>86</sup> vorgeschlagenen Bedingungen statt.

### **2.16.4 Infektion der Zielzellen**

Die Zielzellen wurden bei einer MOI (Multiplicity of Infection; gibt an, wie viele Viren rechnerisch auf eine Zielzelle treffen) von 10 infiziert. Zur Verbesserung der Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran wurde 10 µg / ml Protaminsulfat zugegeben. Nach einem Mediumwechsel am folgenden Tag und einer Wartezeit von fünf Tagen in normalem Wachstumsmedium wurde die Ausschaltung der Zielgene in den Zellen validiert und bei einem positiven Befund weitere Untersuchungen vorgenommen.

## 2.16.5 Validierung der Gen-Ausschaltung

### 2.16.5.1 RNA-Präparation

Die Gesamt-RNA für die Quantifizierung des Ausmaßes der Gen-Ausschaltung wurde wie folgt isoliert: Pro Kammer einer 6-Loch-Platte wurde ein Milliliter TriReagent® (Sigma-Aldrich, München) verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach den Angaben des Herstellers und umfasste eine Ausschüttelung der wässrigen, phenolhaltigen Phase des TriReagents gegen Chloroform. Die in der wässrigen Phase angereicherte RNA wurde anschließend mit Isopropanol gefällt und in 70 % Ethanol gewaschen. Die in RNase-freiem Wasser aufgenommene RNA wurde darauf mit einem Nanodrop-1000 (Peqlab, Erlangen) bei 260 nm photometrisch vermessen.

### 2.16.5.2 Quantifizierung der mRNA mittels quantitativer *Realtime*-PCR

Die Quantifizierung der Expressionslevel der Zielgene erfolgte unter Zuhilfenahme der quantitativen *Realtime*-PCR. In einem ersten Schritt wurde ein Mikrogramm Gesamt-RNA mittels des *Superscript™III First-Strand synthesis* – Systems (Invitrogen, Karlsruhe) in cDNA (kodierende DNA) umgeschrieben. Die Reaktionen der nachfolgenden PCR wurden unter Benutzung des *SYBR Green® PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Darmstadt) auf einer Opticon 1 Platte (MJ-Research, Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch eine Schmelzkurvenanalyse, anhand derer die Anzahl der amplifizierten Produkte errechnet wurde. Der Vergleich der relativen Expressionslevel wurde über die  $2[\Delta\Delta C(T)]$  Methode bewerkstelligt. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung, aus der ein Mittelwert gebildet wurde.

### **2.16.5.3 Hyaluronsäurebestimmung im Überstand**

Die Evaluation der Zielprotein-Ausschaltung auf Produktebene erfolgte über eine Bestimmung der an das Medium abgegebenen Hyaluronsäure wie unter 2.7 beschrieben.

### **2.16.6 Untersuchungen des Phänotyps nach Gen-Ausschaltung**

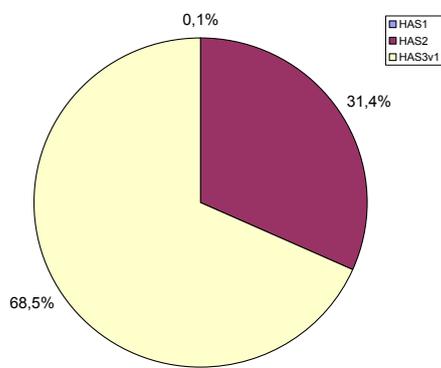
Nach einer Validierung der Ausschaltung des Zielgens auf mRNA- und Produktebene erfolgte die Untersuchung des Einflusses des veränderten Genotyps auf den Phänotyp der Zellen.

Hierzu wurden immunzytochemische Färbungen zur Detektion der Mikrovilli (wie unter 2.11 beschrieben) und Immunoblots (siehe 2.10) zur Untersuchung einer FAK-Degradation durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

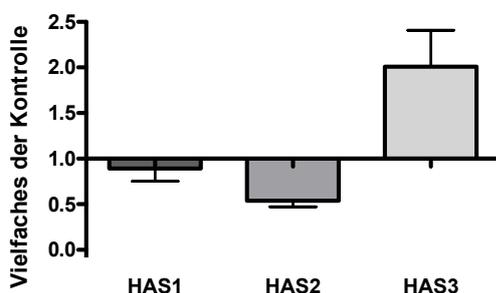
#### 3.1 Einfluss von 4-MU auf die Hyaluronsäuresynthese und Morphologie von OSC1-Zellen

Wie in quantitativen *Realtime*-PCR-Bestimmungen untersucht wurde, zeigten OSC1-Zellen keine signifikante Genexpression von HAS1, eine moderate HAS2-Expression und ein starkes Signal für HAS3-mRNA (**Abbildung 3-1**). OSC1-Zellen wiesen eine Hyaluronsäureproduktion von ca. 125 ng HA /  $\mu\text{g}$  Protein pro 24 h auf.



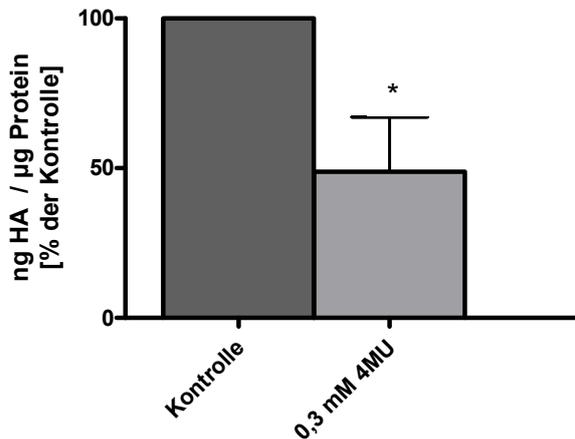
**Abbildung 3-1** OSC1-Zellen zeigten keine signifikante Expression von HAS1, eine moderate Expression von HAS2 und eine dominante HAS3 Expression. Die Bestimmung erfolgte über eine quantitative *Realtime*-PCR. Dargestellt ist ein für  $n=5$  repräsentatives Ergebnis.

Unter Behandlung mit 0,3 mM 4-MU konnten durch quantitative *Realtime*-PCR nur moderate Veränderungen in der Genexpression der drei HAS-Isoformen festgestellt werden (**Abbildung 3-2**).

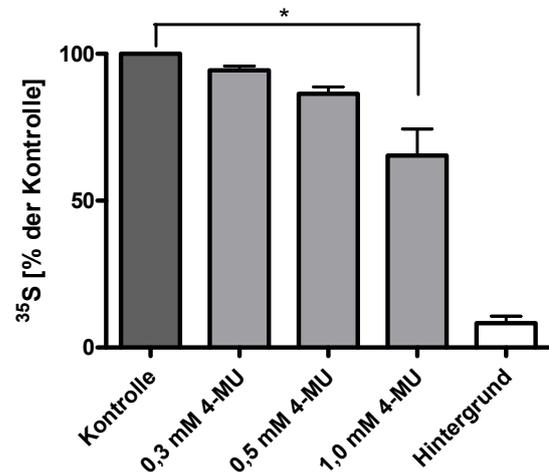


**Abbildung 3-2** Unter einer 24-stündigen Behandlung mit 0,3 mM 4-MU traten keine signifikanten Veränderungen der Genexpression der HAS-Enzyme auf. Angegeben ist das Vielfache der Kontrolle eines für  $n=3$  repräsentativen Versuchs.

Die Untersuchung einer 24-stündigen Behandlung mit 4-MU ergab auf Produktebene eine verringerte Gesamtmenge der in das Zellkulturmedium abgegebenen Hyaluronsäure (**Abbildung 3-3**).



**Abbildung 3-3** Eine 24-stündige Behandlung mit 0,3 mM 4-MU senkte die von OSC1-Zellen an das Medium abgegebene Hyaluronsäuremenge auf 48,81 % ± 18,55 % der Kontrolle, Mittelwert ± SEM, n=3, \*p<0,05. Die Messung erfolgt mit einem ELISA-ähnlichen Versuchsaufbau.

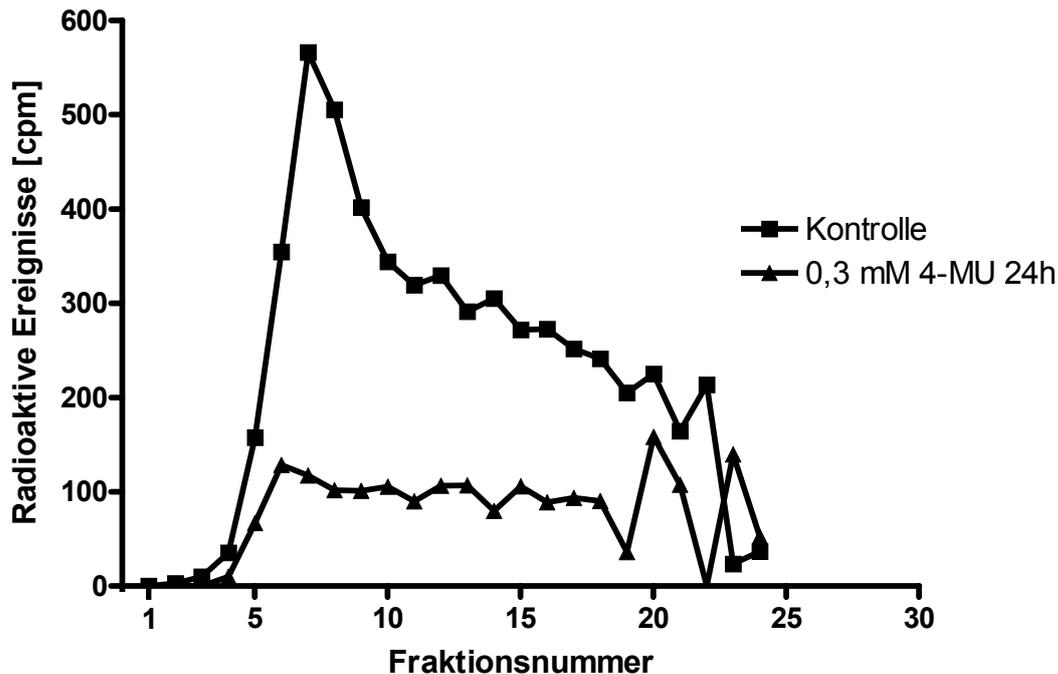


**Abbildung 3-4** 4-MU führte bei einer 24-stündigen Behandlung bis zu einer Konzentration von 0,5 mM nicht zu einer signifikanten Veränderung in der Produktion sulfatierter Glykosaminoglykane. Bestimmung erfolgte mit einem <sup>35</sup>S-Aufnahmeversuch. 0,3 mM 4-MU 94,33 % ± 1,45 %, 0,5 mM 4-MU 86,33 % ± 2,33 %, 1,0 mM 4-MU 65,33 % ± 9,02 %, Hintergrund-Kontrolle 8,33 % ± 2,40 % (Mittelwert ± SEM), n=3, \*p<0,05.

Mittels <sup>35</sup>S-Aufnahme-Experimenten wurde nachgewiesen, dass eine Behandlung mit 4-MU bei Konzentrationen bis zu 0,5 mM keine signifikanten Veränderungen in der Synthese von sulfatierten Glykosaminoglykanen bewirkte. Dies zeigt, dass die Effekte von 4-MU im Hinblick auf den Kohlenhydratanteil der Matrix bis zu einer Konzentration von 0,5 mM 4-MU auf eine Hemmung der Hyaluronsäureproduktion beschränkt sind (**Abbildung 3-4**). Die folgenden Versuche wurden daher mit einer Konzentration von 0,3 mM 4-MU durchgeführt, um nur die spezifischen Effekte der Hyaluronsäuredepletion zu untersuchen.

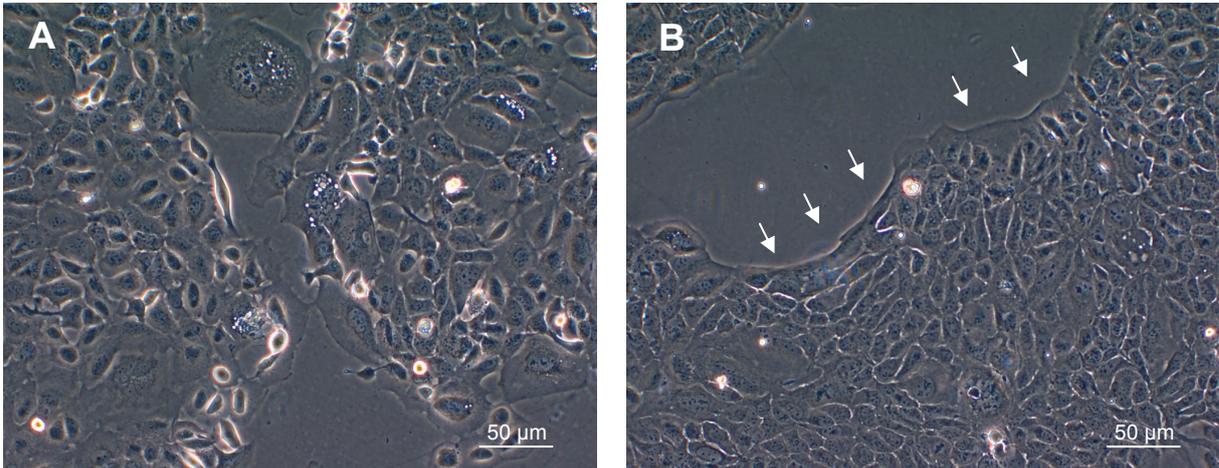
Wie die Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der hydrodynamischen Größe der in das Medium abgegebenen Hyaluronsäure zeigte, war die von OSC1-Zellen sezernierte Hyaluronsäure vornehmlich in Fraktionen zu finden, die

hochmolekulare Hyaluronsäure enthielten, während im intermediären Bereich nur eine basale Exkretion nachgewiesen werden konnte. Nach Behandlung mit 4-MU zeigte sich eine gleichmäßige Hyaluronsäuregrößenverteilung über alle Fraktionen. Dies spricht für einen stärkeren Einfluss von 4-MU auf die Produktion hochmolekularer Hyaluronsäure (**Abbildung 3-5**).



**Abbildung 3-5** Hydrodynamische Größe der in das Medium sezernierten Hyaluronsäure. Die Auftrennung erfolgte über eine 30x1 cm Sephacryl S-1000 Größenaustauschchromatographiesäule in 0,5 M Natriumazetat, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 0,025 % CHAPS, pH 7. Aufgetragen sind auf der Abszisse die volumenbasiert gesammelten Fraktionen, auf der Ordinate die radioaktive Aktivität der einzelnen Fraktionen. Hochmolekulare Hyaluronsäure wurde zuerst eluiert und erscheint in den ersten Fraktionen nach dem Säulentotvolumen. Die starke Anhäufung hochmolekularer Hyaluronsäure in den Fraktionen 5-10 wurde durch eine Behandlung mit 4-MU auf den Level der niedermolekularen Hyaluronsäure nivelliert.

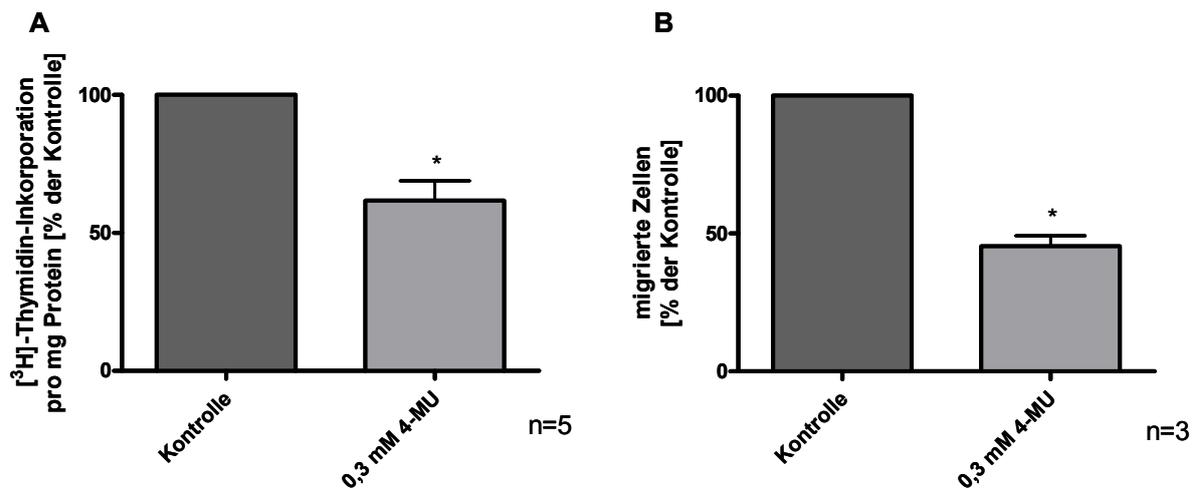
Die Behandlung mit 4-MU führte zu einer morphologischen Veränderung der OSC1 Zellen. Die Zellen zeigten als Phänotyp eine Abflachung und zogen sich in Haufen zusammen (**Abbildung 3-6**). Dieser Vorgang wird auch als *Clustering* bezeichnet. Die Zellränder erschienen im Vergleich zur Kontrolle weicher (Pfeile).



**Abbildung 3-6** Morphologische Veränderung unter 4-MU-Behandlung. (A) Kontrolle, (B) 24-stündige Behandlung mit 0,3 mM 4-MU. Die Zellen erscheinen abgeflacht und zusammengezogen. Die Pfeile zeigen die weicheren Konturen der Zellränder.

### 3.2 4-MU vermittelte Veränderungen der proliferativen und migratorischen Aktivität von OSC1-Zellen

Es wurden funktionelle Experimente durchgeführt, um die Motilität und Proliferation der OSC1-Zellen in Gegenwart von 4-MU zu untersuchen und so den Einfluss von verminderter Hyaluronsäuresynthese auf diese Parameter zu erfassen. Proliferation und Migration wurden signifikant durch 4-MU inhibiert (**Abbildung 3-7**).

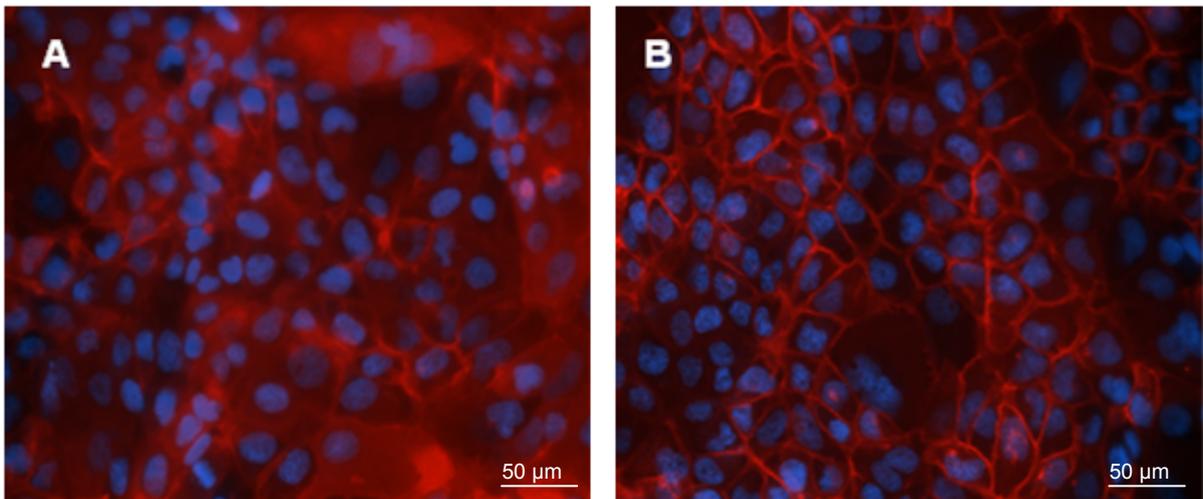


**Abbildung 3-7** (A) Proliferationsversuch. Über die Messung des Einbaus von Tritium-Thymidin bei der DNA-Neusynthese wurde die Proliferationsrate ermittelt und auf Protein bezogen. Eine 24-stündige Behandlung mit 0,3 mM 4-MU führt zu einer Reduktion der Proliferation auf 58,6 % ± 8,5 % der Kontrolle, n=5, \*p < 0,05 (B) Migrationsversuch. Die Bestimmung der migratorischen Aktivität der Zellen erfolgte in einem modifizierten Boyden-Kammer-Versuchsaufbau. Dabei wird die Wanderung der Zellen durch eine mit monomerem Kollagen beschichtete Polycarbonat-Membran gemessen. Als mitogener Stimulus wurde FCS eingesetzt. Die mit 4-MU behandelten Zellen zeigten nur 45 % ± 4 % der Migrationsaktivität von Kontrollzellen, n=3, \*p<0,05.

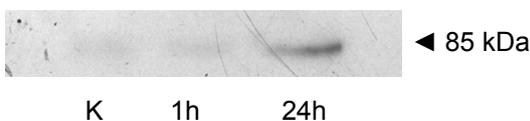
### 3.3 Veränderungen der fokalen Adhäsionen, des Zytoskeletts und des Hyaluronsäurerezeptors CD44 unter 4-MU-Behandlung

Um den Einfluss von 4-MU auf wichtige Zelladhäsionsmoleküle zu untersuchen, wurde die Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 und Bestandteile der fokalen Adhäsionskomplexe (Paxillin, phospho-FAK) sowie Aktin, ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts untersucht. Zu diesem Zweck erfolgten immunzytochemische Anfärbungen der genannten Strukturen.

In der Immunfärbung (**Abbildung 3-8**) ist eine Umverteilung von CD44 zu einer mehr kortikalen Lokalisation zu sehen. Gleichzeitig deutet sich eine verstärkte Expression von CD44 unter Behandlung mit 4-MU an. Um diese zu quantifizieren, wurden Immunoblots auf CD44 durchgeführt. Der Immunoblot (**Abbildung 3-9**) zeigt repräsentativ eine Heraufregulation von CD44 nach 24-stündiger 4-MU-Behandlung (0,3 mM) wohingegen nach einer Stunde keine Veränderungen detektierbar waren. Die Aufregulation des Hyaluronsäurerezeptors CD44 könnte eine Gegenregulation auf die Verknappung an perizellulärer Hyaluronsäure darstellen.

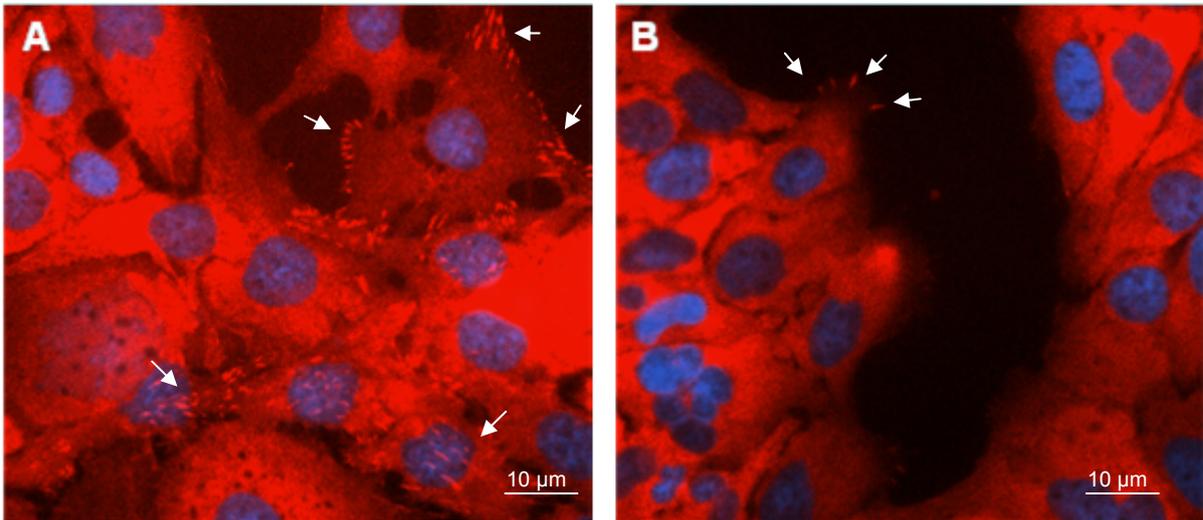


**Abbildung 3-8** Umverteilung des Hyaluronsäurerezeptors CD44 unter einer vierundzwanzigstündigen Behandlung mit 0,3 mM 4-MU. Im Gegensatz zur Kontrolle (A), in der nur eine diffuse Verteilung von CD44 zu erkennen ist, erfolgt unter Behandlung mit 4-MU (B) eine Umverteilung von CD44 in die Membran. Gleichzeitig deutet sich eine verstärkte Expression von CD44 an. Rot=CD44, Blau=Kerne.

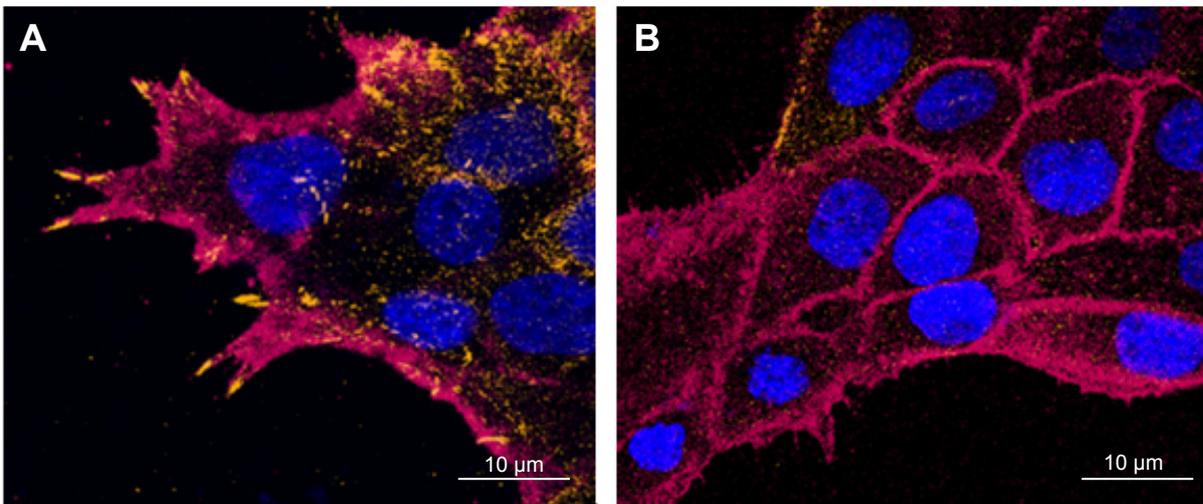


**Abbildung 3-9** Aufregulierung des Hyaluronsäurerezeptors CD44. Es erfolgte eine Behandlung mit 0,3 mM 4-MU. Nach einer Stunde zeigte sich noch kein Unterschied in der Expression, jedoch war nach 24 Stunden eine deutliche Aufregulierung zu erkennen. Dargestellt ist ein für  $n=3$  repräsentativer Blot.

Um die Verteilung und den Aktivierungsstatus der fokalen Adhäsionen zu untersuchen, wurden immunzytochemisch Paxillin, als Marker für die Grundexpression der fokalen Adhäsionen, und an der Autophosphorylierungsstelle (Y397) phosphoryliertes FAK als adhäsions-assoziiertes Aktivierungsmarker, gefärbt.



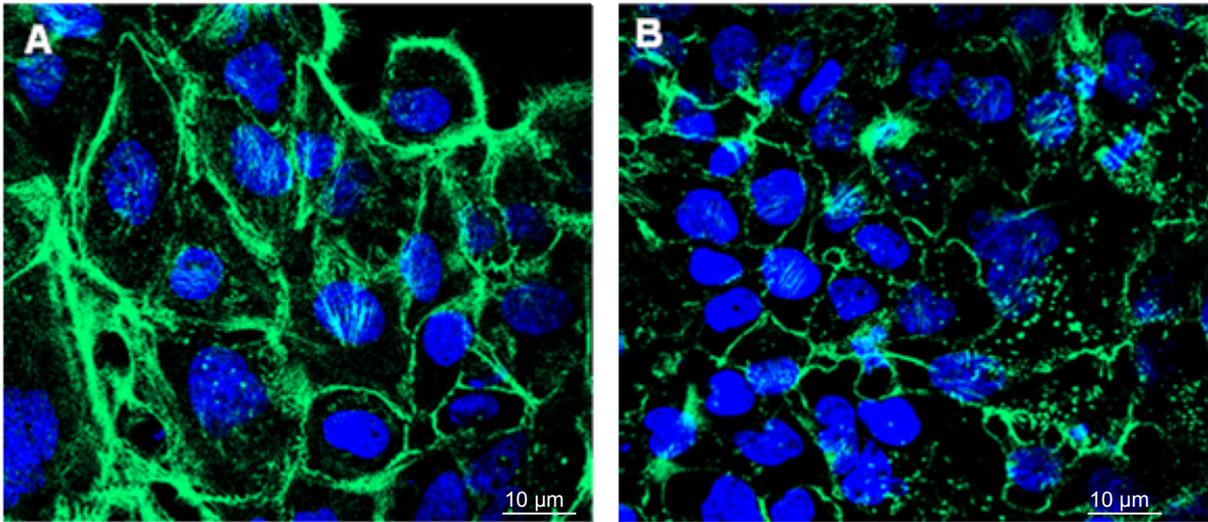
**Abbildung 3-10** Paxillin-Färbung. Eine Behandlung mit 0,3 mM 4-MU für 24 h führte zu einer Abnahme der Expression von fokalen Adhäsionskomplexen, wie durch die Anfärbung von Paxillin (stäbchenförmige Intensitätsanhäufungen in rot) zu beobachten war, Kerne in Blau (A) Kontrolle, (B) 24-stündige Behandlung mit 0,3 mM 4-MU.



**Abbildung 3-11** Phospho-FAK-Färbung. Eine Behandlung mit 0,3 mM 4-MU für 24 h führte zu einer Abnahme der Autophosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (pFAK). Auch die bereits berichtete Zunahme und Umverteilung des CD44-Rezeptors ist gut zu erkennen. Rot = CD44, Orange = pFAK, Blau = Kerne, (A) Kontrolle, (B) 24-stündige Behandlung mit 0,3 mM 4-MU.

Im Gegensatz zu der beobachteten Zunahme von CD44 zeigten sowohl Paxillin (**Abbildung 3-10**, Pfeile) als auch phosphorylierte FAK (**Abbildung 3-11**, orange) eine starke Herabregulierung unter Behandlung mit 4-MU.

Ausgehend von diesem Befund wurde das mit den fokalen Adhäsionen in Kontakt stehende Zytoskelett untersucht. Zu diesem Zweck wurde Aktin über eine Phalloidin-



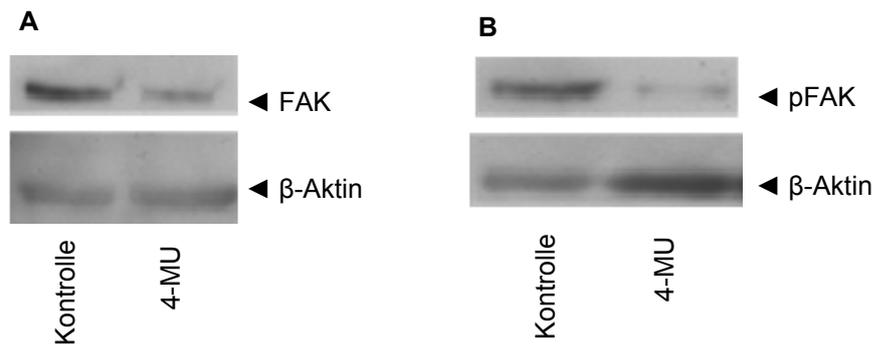
**Abbildung 3-12** Aktin-Färbung. Eine vierundzwanzigstündige Behandlung mit 0,3 mM 4-MU führte zu einem Zusammenbruch des Zytoskeletts. Die Anfärbung erfolgte mit Phalloidin-FITC. Grün=Aktin, Blau=Kerne, (A) Kontrolle, (B) 24-stündige Behandlung mit 0,3 mM 4-MU.

FITC-Sonde angefärbt. Wie in **Abbildung 3-12** zu sehen ist, führte die Behandlung mit 4-MU zu einem Zusammenbruch des kortikal betonten Aktin-Zytoskeletts der OSC1-Zellen.

### 3.4 Calpain-abhängige Verminderung von FAK und phospho-FAK

Um die in **Abbildung 3-10** und **Abbildung 3-11** dargestellte Verminderung an fokalen Adhäsionskomplexen näher zu untersuchen, wurden die Expression und der Phosphorylierungs-Status der fokalen Adhäsionskinase (FAK) im Immunoblot bestimmt.

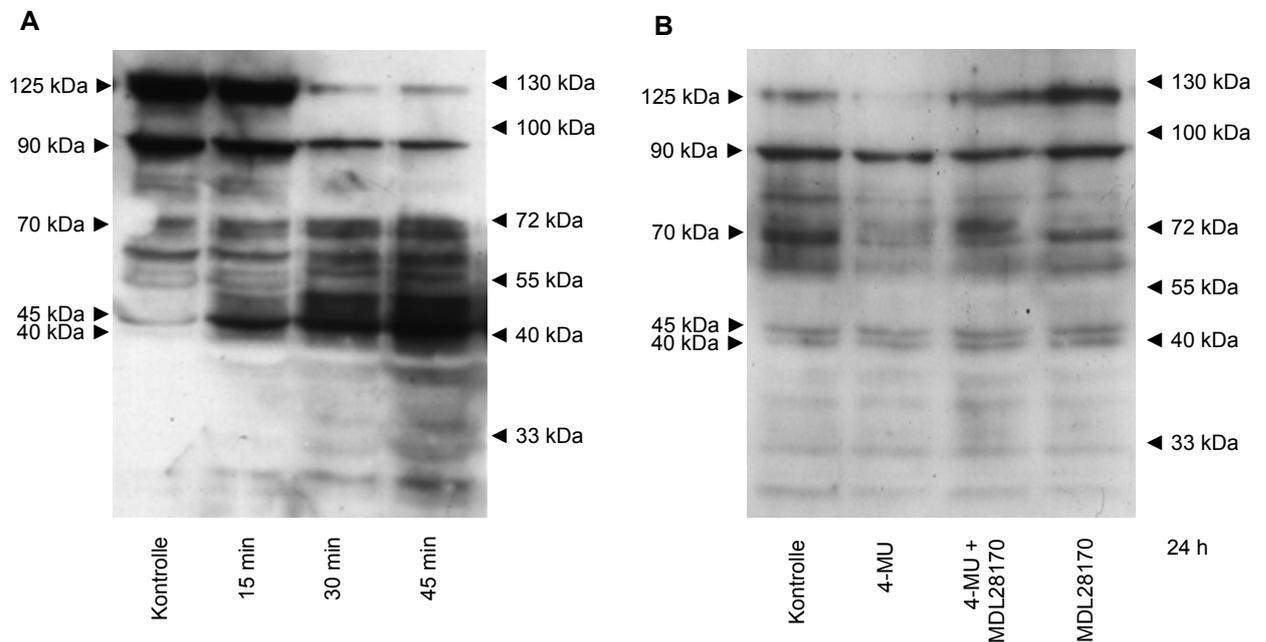
Eine Behandlung mit 0,3 mM 4-MU verringerte sowohl die Expression von Gesamt-FAK-Protein (**Abbildung 3-13 A**) und als auch den Anteil von phosphorylierter FAK (pFAK) (**Abbildung 3-13 B**). Aus den dargestellten repräsentativen Immunoblots lässt sich eine Tendenz zu einer stärkeren Abnahme von pFAK im Vergleich zu Gesamt-FAK erkennen.



**Abbildung 3-13** (A) Herunterregulierung der Gesamt-FAK-Proteinmenge nach einer 24-stündigen Behandlung des OSC1-Zellen mit 0,3 mM 4-MU. (B) Verminderte Phosphorylierung von FAK unter den gleichen Bedingungen. Als Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Dargestellt sind für  $n=4$  repräsentative Immunoblots.

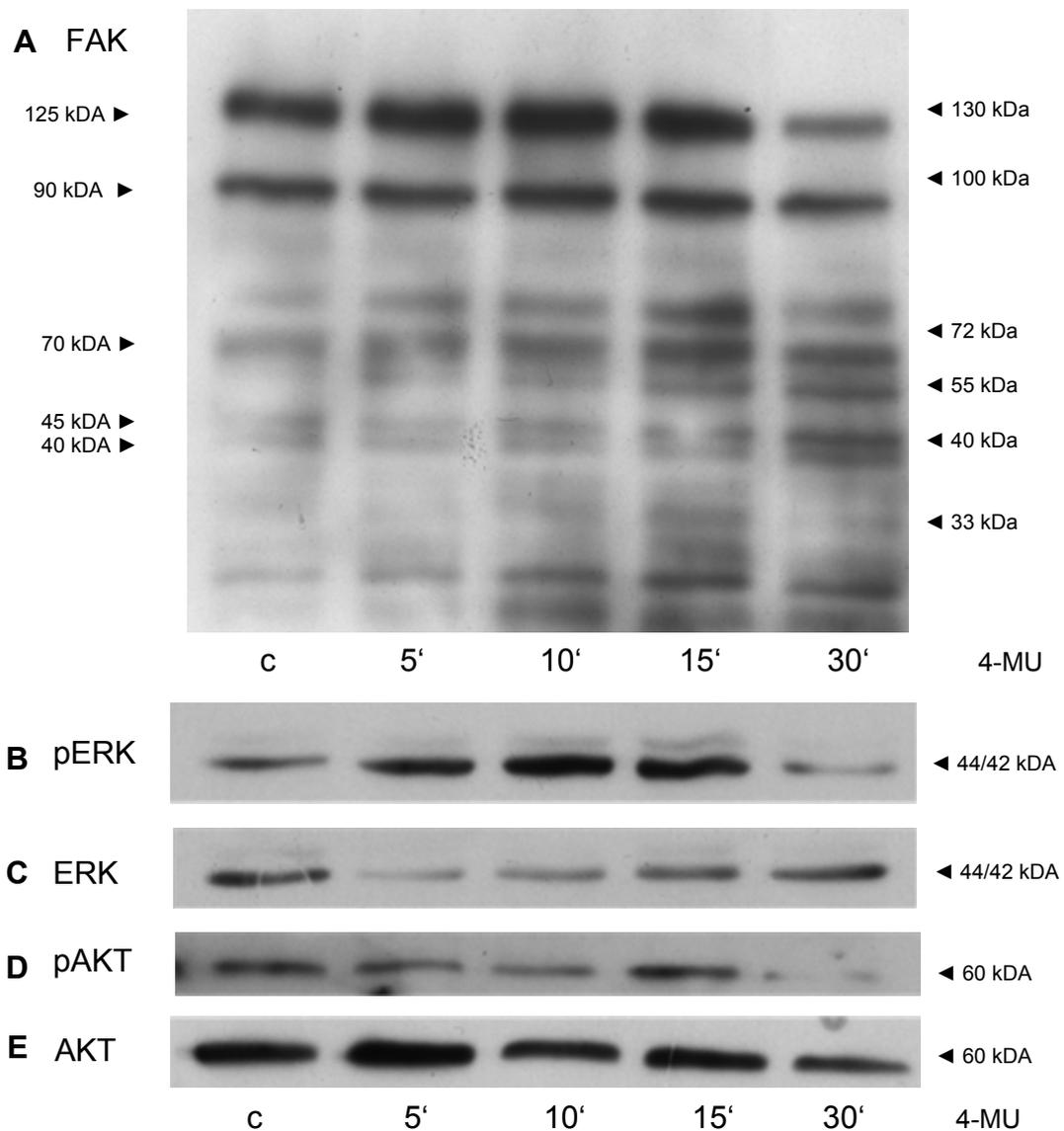
Es könnte also zu einem Verlust an Gesamt-FAK zusätzlich eine verminderte Phosphorylierung von FAK hinzukommen.

Die Kinetik der Gesamt-FAK-Abnahme sowie deren Ursache sind in **Abbildung 3-14** zu sehen. Die Reduktion von Gesamt-FAK wird durch eine Degradation ausgelöst, die zwischen 15 und 30 Minuten nach Zugabe von 4-MU einsetzte und auch noch nach 24 Stunden detektierbar war (**Abbildung 3-14 A**). Zur Detektion der FAK-Abbauprodukte wurde ein Antikörper gegen das C-terminale Ende von FAK eingesetzt (FAK C-20, sc-558, Santa Cruz). Die typischen Hauptbanden lagen entsprechend den Literaturangaben<sup>87,88</sup> bei 125 kDa, 90 kDa, 70 kDa, 45 kDa und 40 kDa. Um die Ursache der Degradierung der FAK zu untersuchen, wurde ein Inhibitor für Calpain eingesetzt, da Calpain neben Caspase-3 das wichtigste in den Abbau von FAK involvierte Enzym darstellt. Die durch 4-MU ausgelöste FAK-Degradierung wurde vom Calpain-Inhibitor MDL28170 bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inhibiert, was darin resultierte, dass die Gesamt-FAK-Protein-Expression auf Kontrollniveau blieb. Die Behandlung von Kontrollzellen mit Calpain-Inhibitor führte sogar zu einem Anstieg an Gesamt-FAK, was mit einem Übergewicht der FAK-Neusynthese nach Wegfall der Degradation erklärt werden kann (**Abbildung 3-14 B**). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass Calpain maßgeblich an der durch 4-MU induzierten FAK-Degradierung beteiligt ist.



**Abbildung 3-14** (A) Der Verlust an FAK-Expression (intakte FAK bei 125 kDa) war bedingt durch eine Degradierung, die zwischen 15 und 30 Minuten nach Behandlung mit 0,3 mM 4-MU einsetzte. Man kann die Zunahme der typischen Degradierungsbanden bei 90 kDa, 70 kDa, 45 kDa und 40 kDa erkennen. (B) Die Tatsache, dass die FAK-Degradierung nach 24 Stunden durch die Behandlung mit dem Calpain-Inhibitor MDL28170 (25 µg / ml) verhindert werden konnte, weist auf die Beteiligung von Calpain an der Degradation hin. Der Anstieg an Gesamt-FAK unter Kontrolle und MDL28170 lässt auf ein Überwiegen der Gesamt-FAK-Synthese bei verminderter FAK-Degradierung schließen. Dargestellt sind zwei für jeweils n=3 repräsentative Immunoblots.

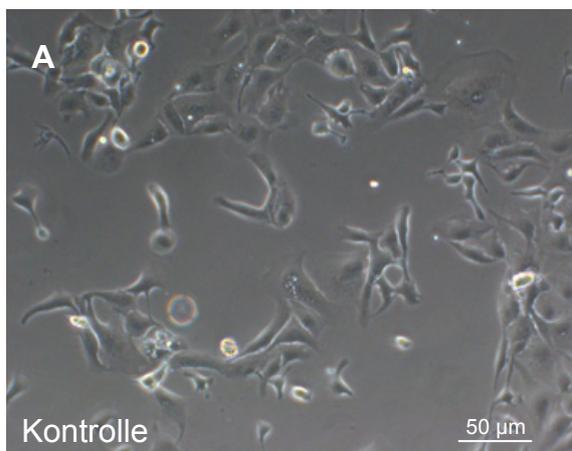
Der gesteigerte FAK-Abbau (**Abbildung 3-15 A**) führte spätestens nach 30 Minuten zu einer verminderten Phosphorylierung der nachgeschalteten Signalproteine ERK (extrazellulär regulierte Kinase) (**Abbildung 3-15 B, C**) and AKT (Proteinkinase B) (**Abbildung 3-15 D, E**) und damit zu deren Inhibition. In Bezug auf die Phosphorylierung von ERK lässt sich ein transienter Anstieg zwischen 5 und 15 Minuten erkennen. Bei AKT ist nur ein kurzer Anstieg nach 15 Minuten zu beobachten.



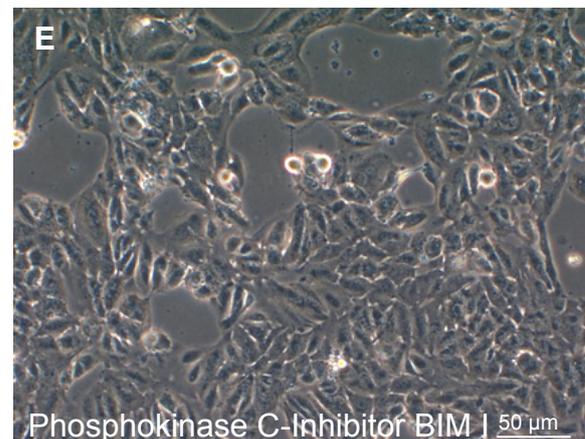
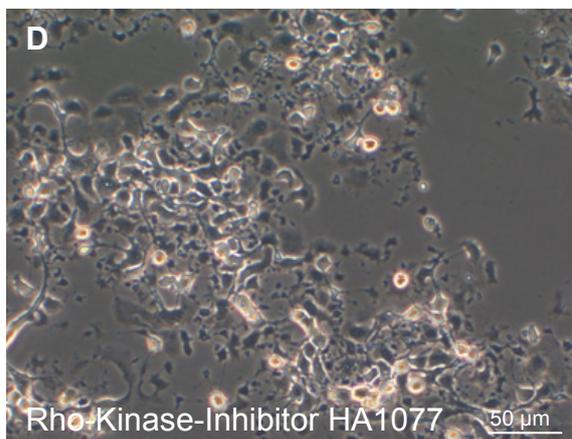
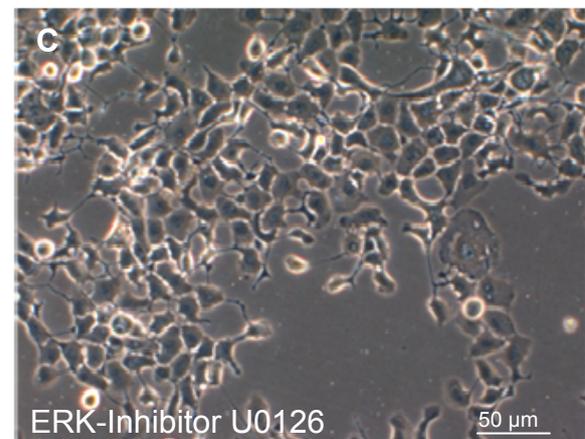
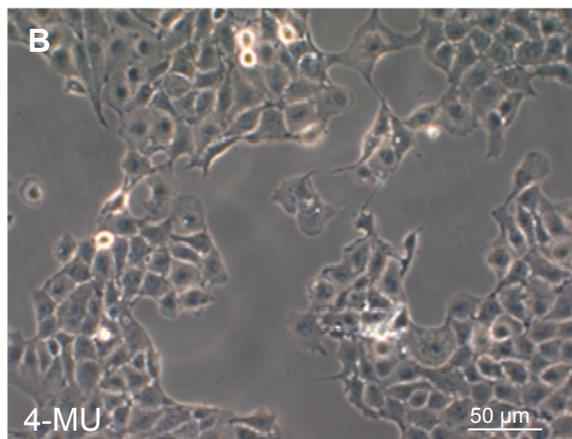
**Abbildung 3-15** Zeitverlauf der FAK-Degradation (A) und der Phosphorylierung in den nachgeschalteten Signalwegen. Nach einem transienten Anstieg zwischen 5 und 15 Minuten nimmt die Phosphorylierung von ERK (pERK) stark ab. (B) phospho-ERK, (C) ERK. Die Phosphorylierung von AKT steigt zwischen 10 und 15 Minuten an, um danach stark abzusinken (D) phospho-AKT, (E) AKT. Gezeigt sind für n=3 repräsentative Immunoblots.

### 3.5 Einfluss von Inhibitoren verschiedener Signaltransduktionswege auf den Phänotyp von OSC1

Um die Beteiligung der verschiedenen durch FAK aktivierten Signaltransduktionswege an der morphologischen Veränderung der OSC1-Zellen zu untersuchen, wurden spezifische Inhibitoren für den ERK-Signalweg (U0126, 1  $\mu$ M), den PI3K-Signalweg (LY294002, 10  $\mu$ M), den PKC (Phosphokinase C)-Weg (Bisindolylmaleimid I, 1  $\mu$ M) und den Rho-Kinase-Weg (HA1077, 1  $\mu$ M) eingesetzt.



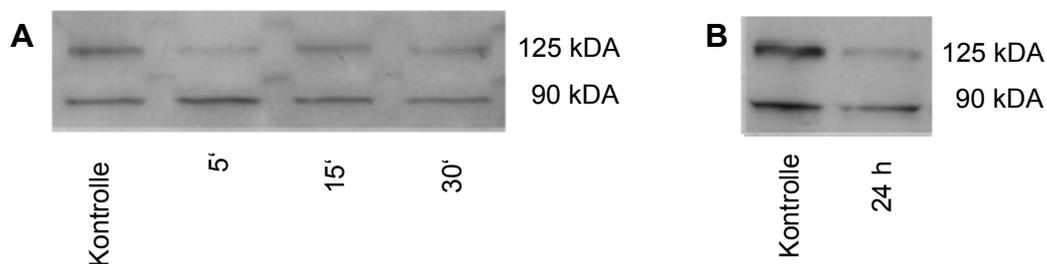
**Abbildung 3-16** Die Auswirkung verschiedener Signalweg-Inhibitoren auf die Morphologie von OSC1-Zellen. Der ERK-Inhibitor U0126 verursachte 30 min nach Behandlungsbeginn einen Phänotyp (C) der sich ähnlich dem unter 4-MU-Behandlung (B) darstellte. Es war ein Zusammenziehen und eine Abflachung der Zellen zu sehen. Der Rho-Kinase-Inhibitor HA1077 führte zur Fragmentierung der Zellen (D), während der PKC-Inhibitor BIM I eine Verdickung und Streckung der Zellen verursachte.



Es zeigte sich, dass nur die Behandlung mit dem ERK-Inhibitor zu einem Phänotyp führte, der dem unter 4-MU-Einfluss (**Abbildung 3-16 B**) glich: Es war eine Abflachung und ein Zusammenziehen der Zellen zu beobachten (**Abbildung 3-16 C**). Der Rho-Kinase-Inhibitor führte zu einer weitgehenden Fragmentierung der Zellen (**Abbildung 3-16 D**), während die Behandlung der Zellen mit dem PKC-Inhibitor in einer Verdickung und Streckung der Zellen (**Abbildung 3-16 E**) resultierte. Hingegen zeigte sich unter einer Behandlung mit dem PI3-Kinase-Inhibitor keine morphologische Veränderung der OSC1-Zellen.

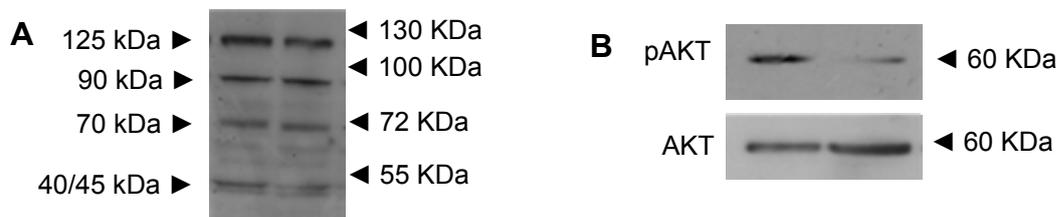
### 3.6 Einfluss anderer Hyaluronsäure-„Antagonisten“ auf die FAK-Degradation

Um zu verifizieren, dass die von 4-MU ausgelösten Effekte hyaluronsäureabhängig waren, wurden andere Möglichkeiten untersucht, in die Hyaluronsäure-Matrix einzugreifen. Dabei wurde eine FAK-Degradierung auch bei der Behandlung mit Substanzen gefunden, die einen anders gearteten negativen Einfluss auf Hyaluronsäure-Funktionen ausüben als 4-MU. So führte der Verdau der perizellulären Hyaluronsäure-Matrix durch Zugabe von 5 U / ml *Streptomyces* Hyaluronidase zu einem gesteigerten FAK-Abbau, der bereits nach 5 Minuten einsetzte und für mehrere Stunden anhielt (**Abbildung 3-17 A**). Pep-1, ein Peptid, das Hyaluronsäure von seinen Bindungsstellen verdrängt, wurde erstmals von Mummert *et al.*<sup>89</sup> beschrieben. In einer Konzentration von 500 µg / ml führte Pep-1 zu einer nach 24 Stunden nachweisbaren FAK-Degradierung (**Abbildung 3-17 B**).



**Abbildung 3-17** (A) Eine Behandlung mit 5 U / ml *Streptomyces* Hyaluronidase führte bereits nach 5 Minuten zu einer Degradation von FAK, die für die Dauer mehrerer Stunden anhielt. (B) Das Hyaluronsäure-verdrängende Peptid Pep-1 (500 µg / ml) zeigte erst nach 24 Stunden einen Einfluss auf die FAK Degradation. Dargestellt sind für n=3 repräsentative Immunoblots.

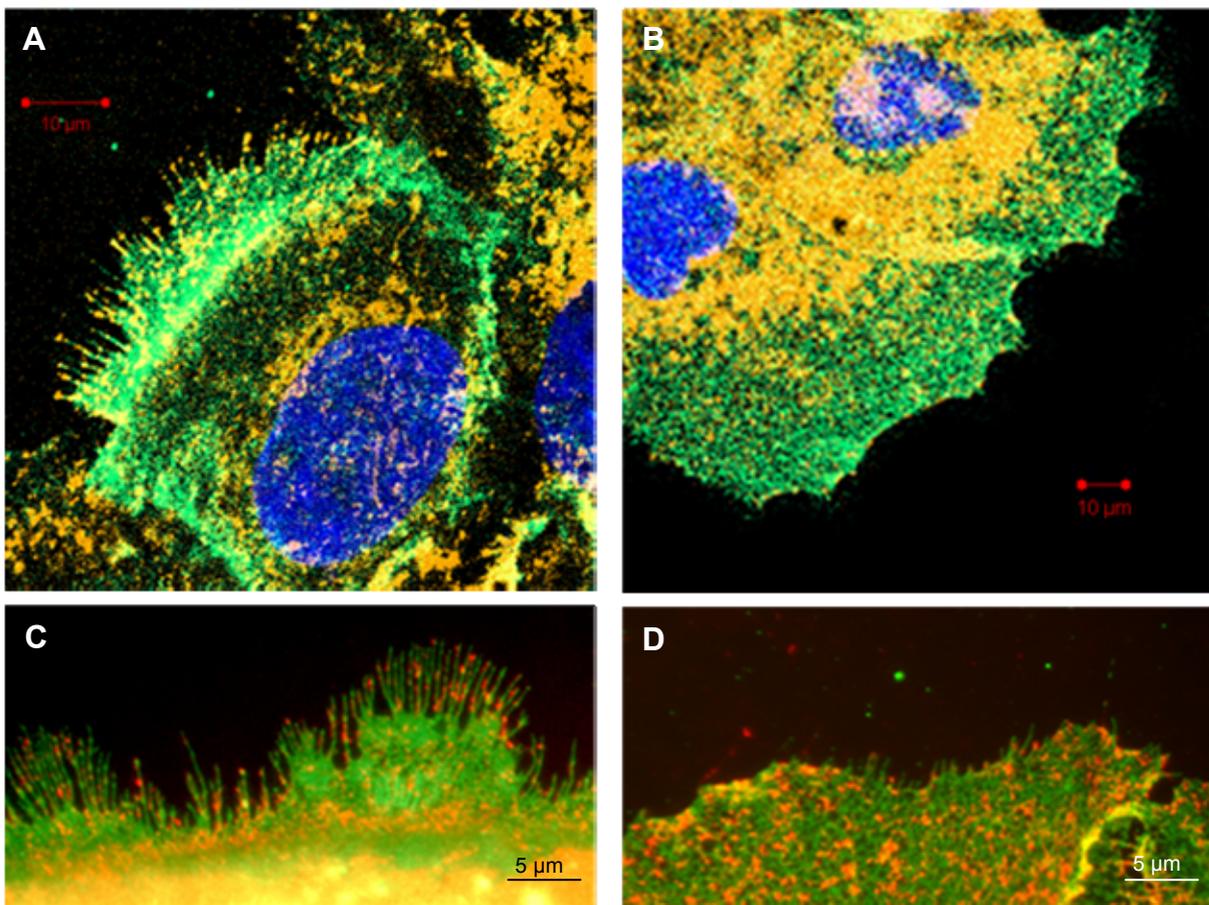
Um die Beteiligung des Hyaluronsäurerezeptors CD44 an den beobachteten Effekten von 4-MU zu untersuchen, erfolgte eine Ausschaltung der CD44 vermittelten Signaltransduktion mit einem blockierenden CD44-Antikörper. Dies führte allerdings weder zu einer FAK-Degradation (**Abbildung 3-18 A**), noch zu einer morphologischen Veränderung der Zelle. Die Phosphorylierung des wichtigsten nachgeschalteten Signalproteins, AKT, konnte hingegen stark gesenkt werden (**Abbildung 3-18 B**), was einen Beweis für die Funktionsfähigkeit des Antikörpers darstellt.



**Abbildung 3-18** Die Blockade von CD44 führte nicht zu einer FAK-Degradation (A). Als Positiv-Kontrolle wurde die Phosphorylierung des nachgeschaltete Zielproteins von CD44, AKT untersucht. Es kam zu der erwarteten Dephosphorylierung (B). Dargestellt sind für n=3 repräsentative Blots. Die Probennahme erfolgte nach 24 Stunden unter einer Behandlung mit 0,3 mM 4-MU.

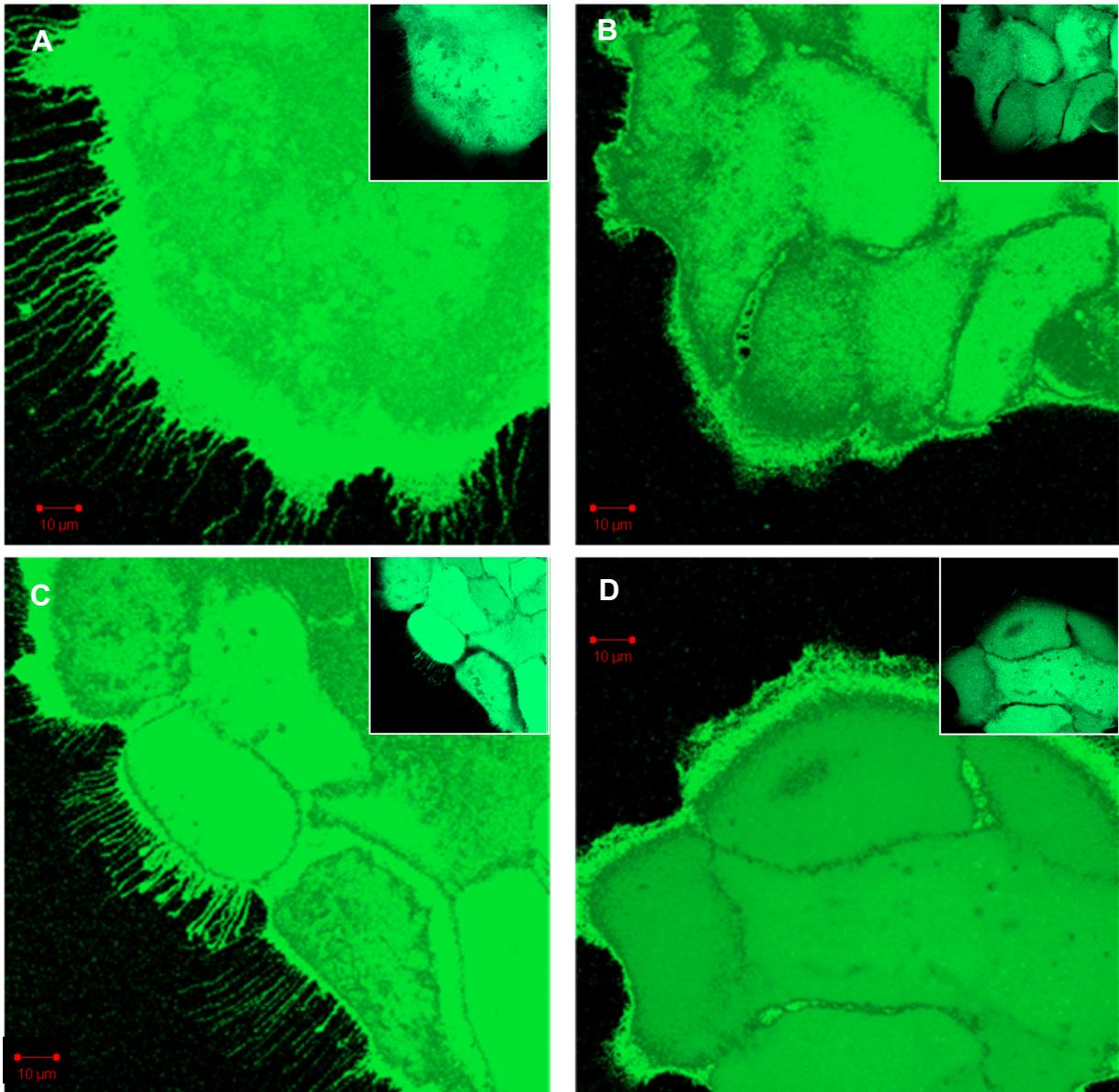
### 3.7 OSC1-Zellen wiesen Hyaluronsäure-assoziierte Zellfortsätze auf, die unter Einfluss von 4-MU zerstört wurden

Fixierte OSC1 Zellen zeigten bei einer immunzytochemischen Färbung für CD44 oder bei einer Anfärbung mit einem Membranmarker (*Image-iT<sup>®</sup> LIVE Plasma Membrane Marker*, Invitrogen, Karlsruhe) eine Vielzahl an langgestreckten, mitunter verzweigten Zellfortsätzen, die, wie durch Hyaluronsäurebindeprotein nachgewiesen wurde, von einer Hyaluronsäurematrix umgeben waren und unter einer Behandlung mit 4-MU verschwanden (**Abbildung 3-19**).



**Abbildung 3-19** Konfokale (A, B) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (C, D) von membran-assoziierten Zellfortsätzen (A, C) und deren Rückbildung nach vierundzwanzigstündiger Behandlung mit 0,3 mM 4-MU (B, D). Die Hyaluronsäure (orange) kann dabei fixierungsbedingt nur in Form kleiner Aggregate angefärbt werden. Grün = CD44, Orange = Hyaluronsäure, Blau = Kern.

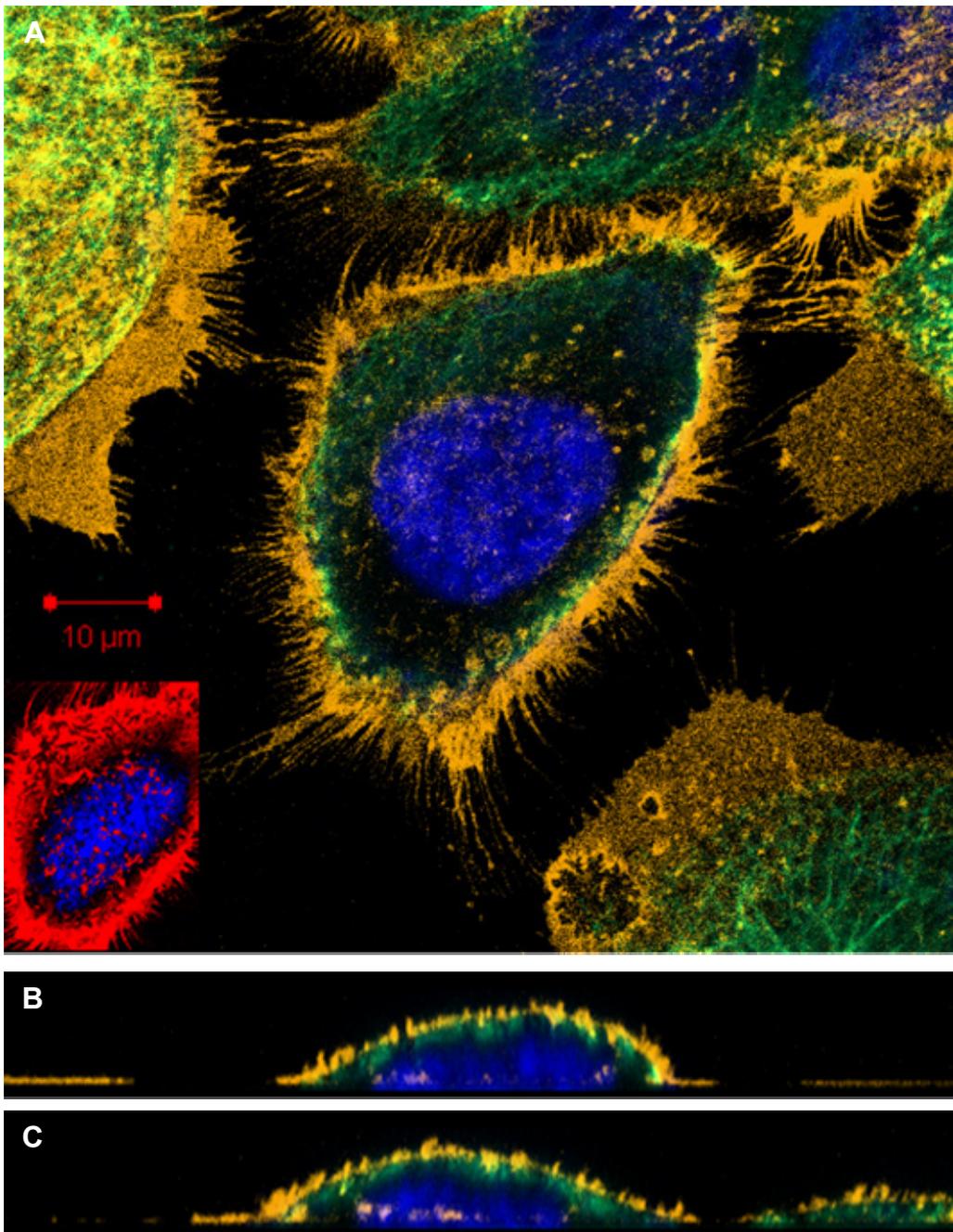
Auch bei lebenden Zellen konnten diese Zellfortsätze, und ihre Auflösung unter einer Behandlung mit 4-MU, durch eine Calcein-Färbung ( $2\ \mu\text{M}$ ) nachgewiesen werden (**Abbildung 3-20**). Das beweist, dass sie keine durch die Fixierung bedingten Artefakte darstellen.



**Abbildung 3-20** Anfärbung lebender OSC1-Zellen mit  $2\ \mu\text{M}$  Calcein (A-D). Das volle Ausmaß der Zellfortsätze wurde erst nach einer elektronischen Kontrastverbesserung sichtbar (Ausgangsbilder in der rechten oberen Ecke). Auch hier zeigte sich unter Behandlung mit 4-MU eine Auflösung der protrusiven Strukturen. (A,C) Kontrolle, (B,D) 24-stündige Behandlung mit  $0,3\ \text{mM}$  4-MU.

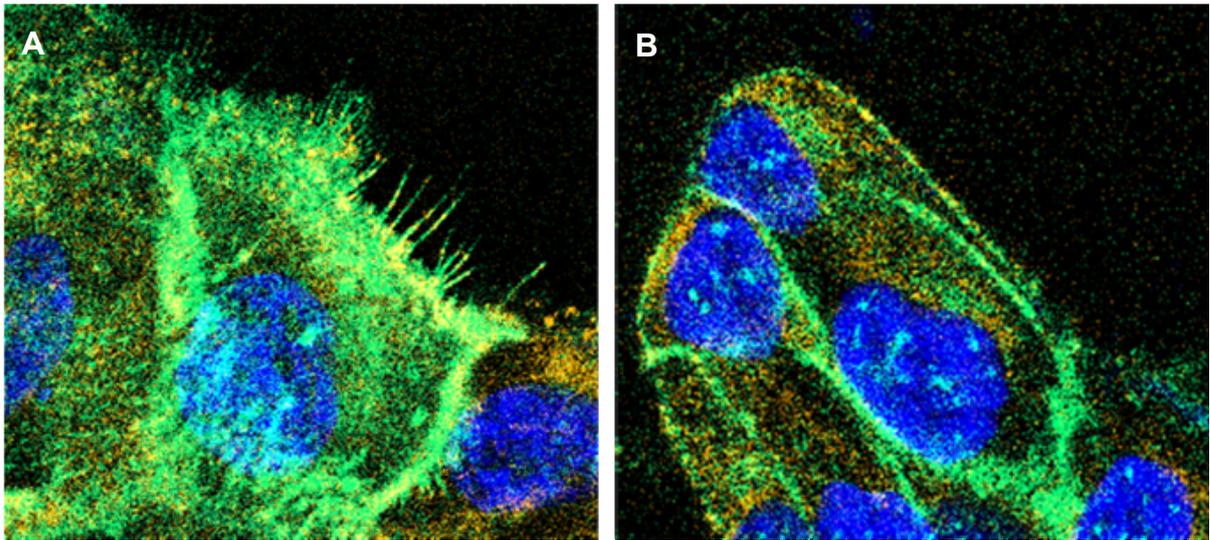
Die beobachteten Strukturen sind hauptsächlich flache, tendenziell eher oberflächenassoziierte Zellfortsätze, die allerdings, wie mit einer konfokalen Stapelaufnahme gezeigt werden konnte, auch dreidimensional über die Zelle verteilt vorlagen und in die Betrachtungsebene hineinzeigten (**Abbildung 3-21**).

Die in die z-Ebene ragenden Strukturen wurden mit einer Höhenebenauswertung (Insert in Rot) elektronisch verstärkt und besser sichtbar gemacht.



**Abbildung 3-21** Konfokale Stapelaufnahme einer OSC1-Zelle zur Bestimmung der Lokalisation der protrusiven Strukturen. (A) zeigt eine Schnittebene nahe der Zellkulturschalenoberfläche. In dieser ist im Vergleich mit den in der Seitenansicht (B, C) erkennbaren Fortsätzen ein stärkeres Ausmaß an protrusiven Strukturen zu erkennen. Grün = Hyaluronsäure, Orange = Membranmarker, Blau = Kerne. Das Insert in Rot in (A) zeigt eine Höhenebenen-Auswertung, anhand derer sich die in die Betrachtungsebene hereinragenden Spitzen deutlicher zeigen (rote Punkte).

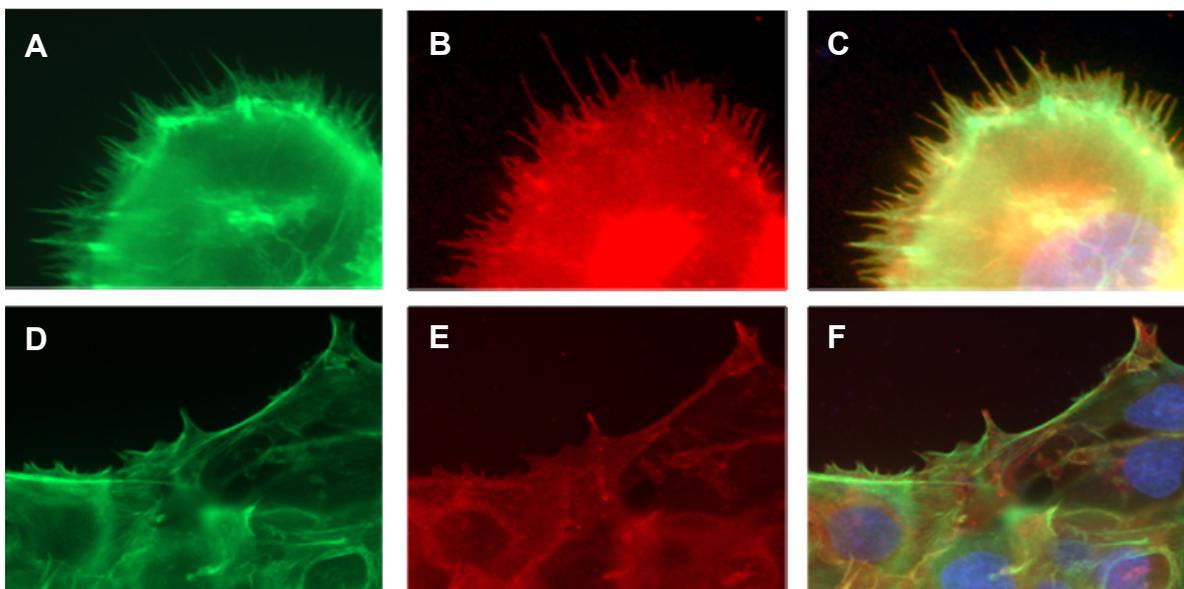
Um die Abhängigkeit der beobachteten Effekte von 4-MU auf die Zellfortsätze zu beweisen und hyaluronsäureunabhängige Wirkungen als Ursache auszuschließen, wurde *Streptomyces* Hyaluronidase (5 U / ml) zugegeben, um den Hyaluronsäuremantel zu verdauen (**Abbildung 3-22**). Bereits nach 15 Minuten waren keine Zellfortsätze mehr erkennbar.



**Abbildung 3-22** Um die Hyaluronsäure-Abhängigkeit der Zellfortsätze (A) zu überprüfen, wurden 5 U/ml *Streptomyces* Hyaluronidase eingesetzt. Bereits nach 15 Minuten zeigte sich eine Rückbildung der protrusiven Strukturen (B). Orange = Hyaluronsäure, Grün = CD44, Blau = Kerne.

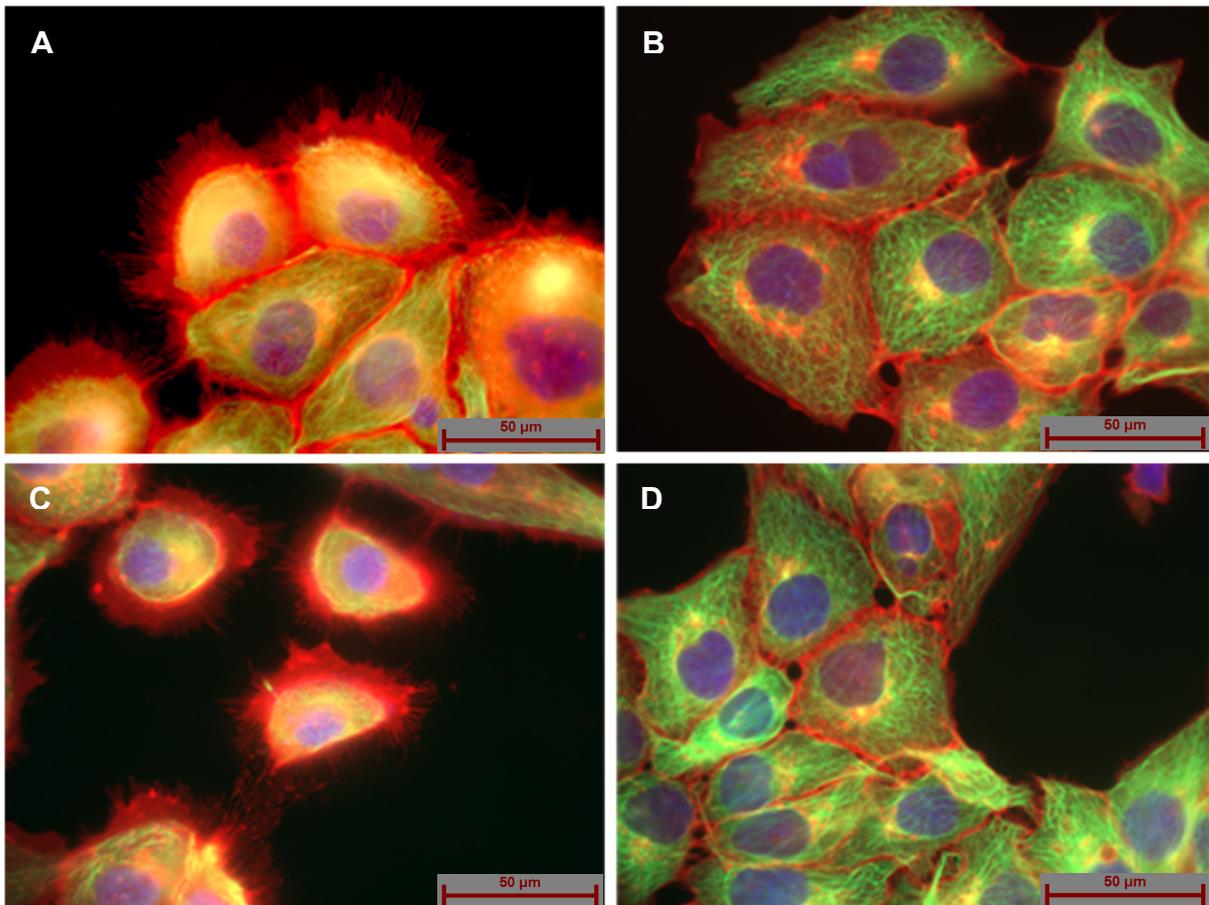
### 3.8 Die beobachteten Zellfortsätze waren protrusiv, enthielten Aktinfasern und fokale Adhäsions-Komplexe, aber kein Tubulin

Um zu überprüfen, ob die Zellfortsätze eine Verbindung zum Zytoskelett aufweisen, wurde eine Aktinfärbung durchgeführt, die ein starkes Signal für Aktin in den Zellfortsätzen ergab (**Abbildung 3-23 A-C**). Auch in der Aktin-Färbung ist eine deutliche Abnahme in der Zahl der Zellfortsätze unter Behandlung mit 4-MU zu erkennen (**Abbildung 3-23 D-F**).



**Abbildung 3-23** Anfärbung der Aktin-Fasern mit FITC-markiertem Phalloidin und Kolo-kalisation mit Membranmarker zum Nachweis des Aktin-gehalts der Zellfortsätze. (A,B,C) Kontrolle, (D,E,F) 24-stündige Behandlung mit 0,3 mM 4-MU. (A,D) Grün = Aktin, (B,E) Rot = Membranmarker, Blau = Kerne (C,F) Überlagerung beider Kanäle.

Hingegen konnte trotz eines stark ausgeprägten Tubulin-Gerüsts der OSC1-Zellen kein Tubulin in den Zellfortsätzen detektiert werden (**Abbildung 3-24**). Anhand dieser Abbildung lässt sich auch gut der phänotypische Unterschied zwischen Kontrolle und mit 4-MU behandelten Zellen erkennen. Die behandelten Zellen erscheinen verglichen mit der Kontrolle breiter, abgeflacht und sind in Gruppen zusammengelagert.

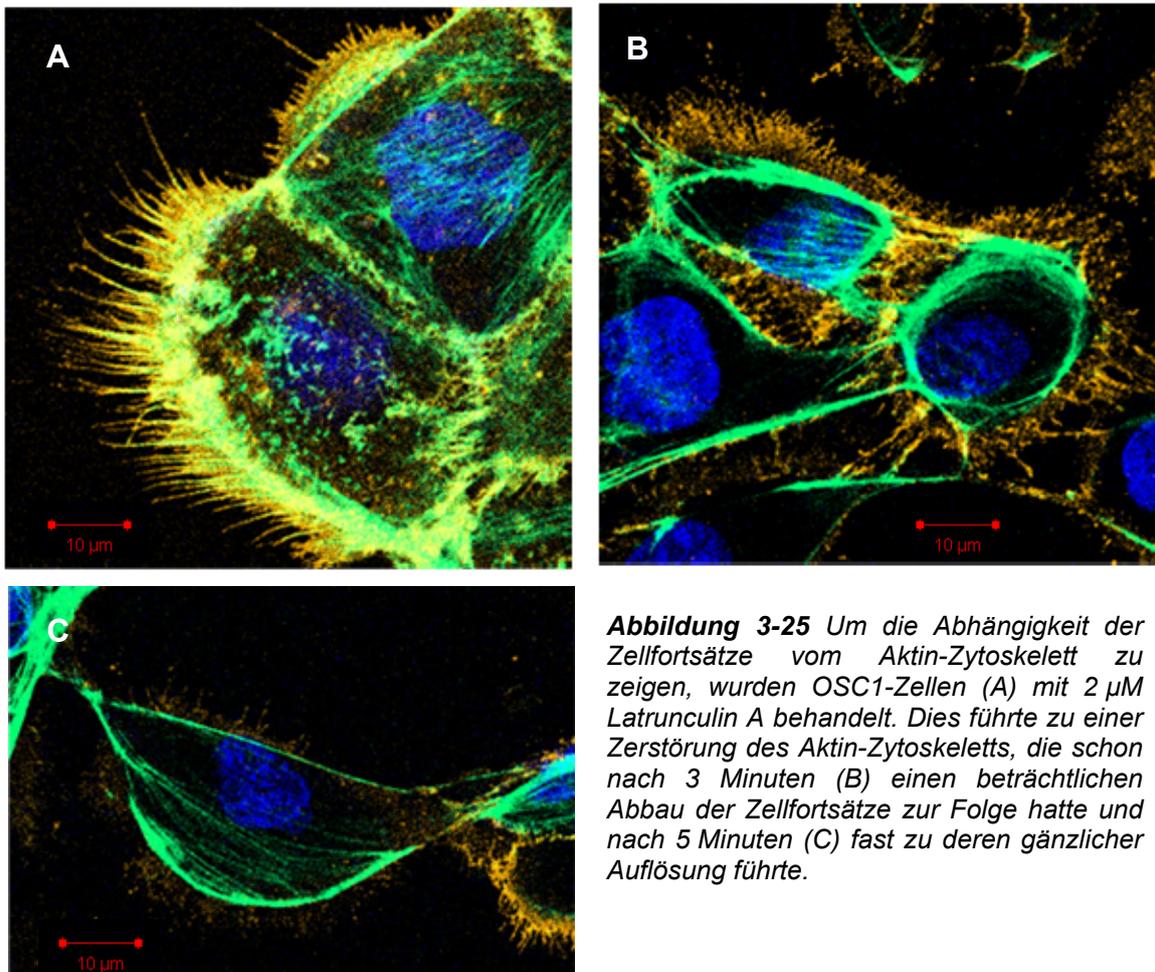


**Abbildung 3-24** Tubulin-Färbung. OSC1-Zellen weisen ein markantes Tubulin-Gerüst auf, das allerdings nicht bis in die Zellfortsätze reicht. (A,C) Kontrolle, (B, D) 24-stündige Behandlung mit 0,3 mM 4-MU. Auffallend ist auch hier die phänotypische Veränderung der OSC1-Zellen unter 4-MU-Behandlung. Die behandelten Zellen erscheinen verglichen mit der Kontrolle breiter, abgeflacht und sind in Gruppen zusammengelagert. Grün=Tubulin, Rot=Membranmarker, Blau=Kerne.

Um eine Beteiligung von Aktin am Aufbau und der Aufrechterhaltung der Zellfortsätze zu untermauern, wurde Latrunculin A (2 µM), ein Aktin-Polymerisations-Inhibitor, benutzt, der in der Folge durch die fortwährenden Umbauprozesse des Aktin-Zytoskeletts zu einer Depolymerisation von Aktinfasern führt (**Abbildung 3-25**).

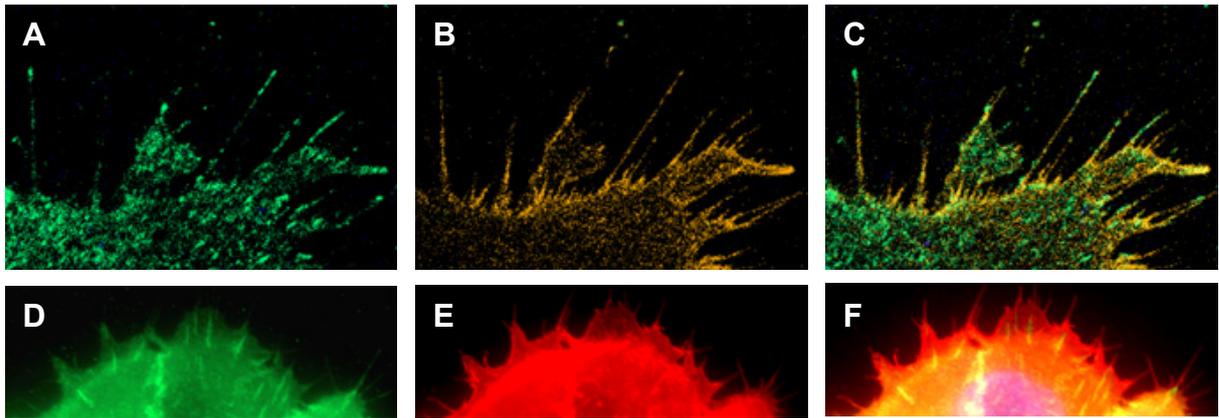
Eine bereits nach 3 Minuten einsetzende Aktin-Depolymerisation (**Abbildung 3-25 B**) zog eine sofortige Auflösung der in den Zellfortsätze befindlichen Aktinfasern nach sich, während der kortikale und zentrale Teil des Aktinzytoskeletts noch intakt waren.

Zu diesem Zeitpunkt konnte man anhand der Membranfärbung noch die vormalige Struktur einzelner Zellfortsätze erkennen. Das war bereits nach 5 Minuten Behandlungsdauer (**Abbildung 3-25 C**) kaum noch möglich. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Fortsätze einen Teil des Zytoskeletts darstellen und mit diesem verbunden sind.



**Abbildung 3-25** Um die Abhängigkeit der Zellfortsätze vom Aktin-Zytoskelett zu zeigen, wurden OSC1-Zellen (A) mit 2 µM Latrunculin A behandelt. Dies führte zu einer Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts, die schon nach 3 Minuten (B) einen beträchtlichen Abbau der Zellfortsätze zur Folge hatte und nach 5 Minuten (C) fast zu deren gänzlicher Auflösung führte.

Um die Verteilung der mit den Aktinfasern assoziierten fokalen Adhäsionskomplexe zu untersuchen, wurden Färbungen mit einem phospho-Tyrosin-Antikörper (pTyr 100) durchgeführt.

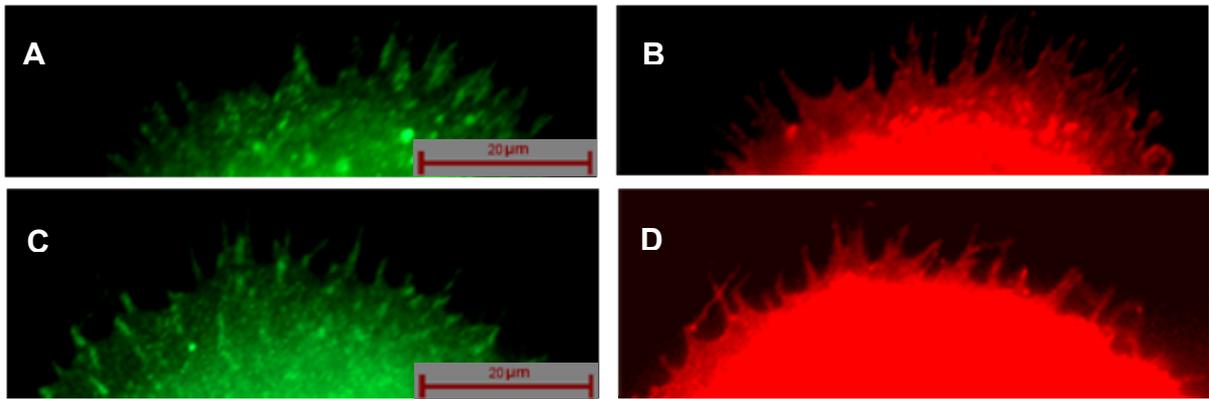


**Abbildung 3-26** Mit Hilfe eines phospho-Tyrosin-Antikörpers, der mit hoher Sensitivität phosphorylierte Proteine anzeigt, wurde phospho-FAK detektiert. Phospho-FAK, als Marker für einen aktiven fokalen Adhäsionskomplex, konnte in der Spitze (A-C) und in der Wurzel (D-F) der Mikrovilli detektiert werden. (A,D) pTyr 100, (B,E) Membranmarker, (C,F) Überlagerung beider Kanäle.

pTyr 100 bietet vor allem bei naszierenden fokalen Adhäsionskomplexen den Vorteil einer frühen Detektion, da es sehr sensitiv auf phosphorylierte Proteine z.B. pFAK reagiert. Wie in **Abbildung 3-26** dargestellt, konnte bei einem Teil der Zellfortsätze phospho-FAK in der Spitze (**Abbildung 3-26 A-C**, Pfeile) festgestellt werden, bei einem anderen Teil an der Wurzel (**Abbildung 3-26 D-F**, Pfeile). Eine Detektion mit einem pFAK-Antikörper war durch ein unzureichendes Signal-Hintergrundverhältnis nicht möglich.

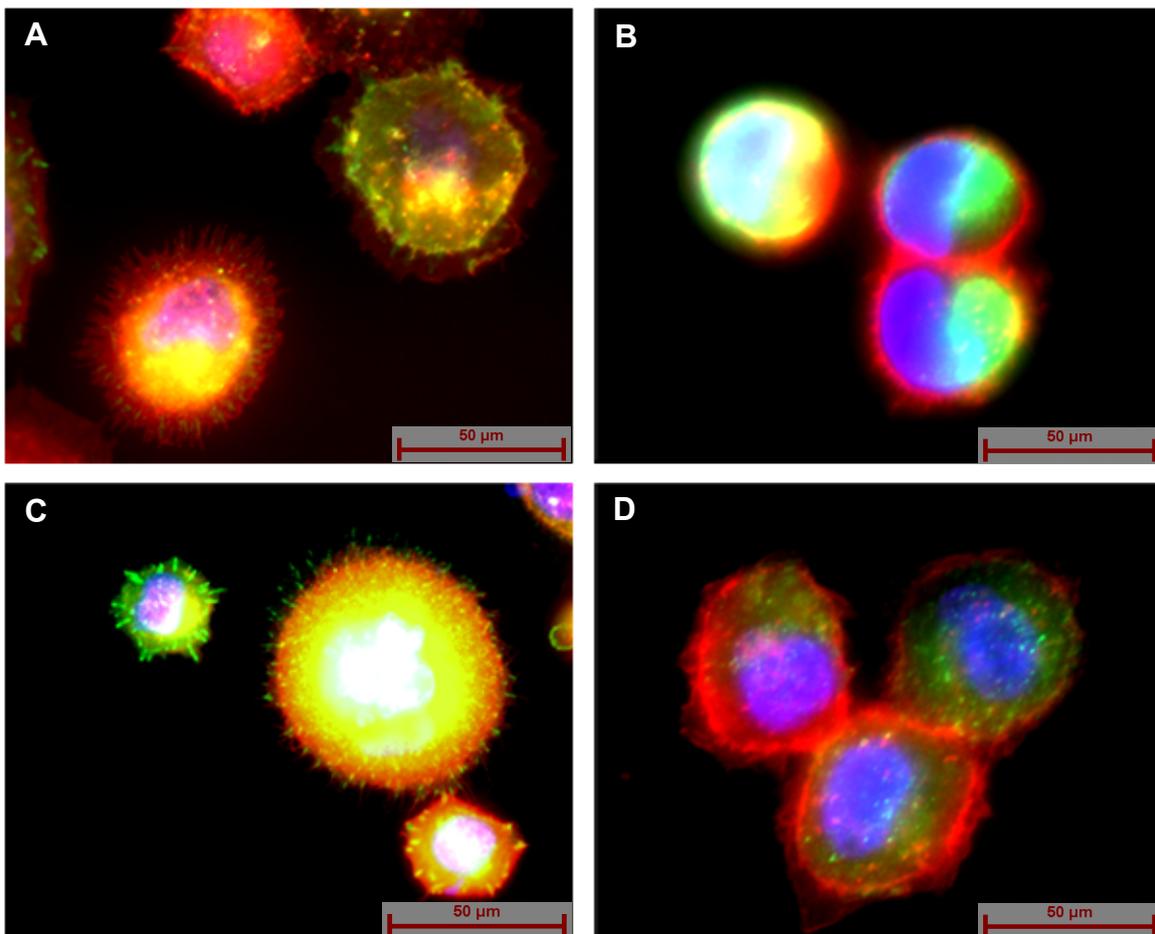
Um die Protrusivität der Zellfortsätze nachzuweisen und sie so von Rückzugsfasern zu unterscheiden, wurde ein Adhäsions- und Wachstumsversuch auf Fibronectin-beschichteten Deckgläsern durchgeführt. Da in der frühen Phase der Anheftung ausschließlich im Aufbau befindliche Zellstrukturen zu erwarten sind, zeigt eine Detektion der Zellfortsätze in diesem Stadium deren protrusiven Charakter an.

Bereits zehn Minuten nach Aussaat waren sowohl erste frühe fokale Adhäsionskomplexe als auch protrusive Strukturen detektierbar (**Abbildung 3-27 A, B**). Nach weiteren zehn Minuten hatte die Zahl der fokalen Adhäsionskomplexe stark zugenommen und es war eine große Anzahl von Zellfortsätzen zu erkennen (**Abbildung 3-27 C, D**). Mit einem Antikörper gegen phospho-Tyrosin, der in diesem Wachstumsstadium hauptsächlich pFAK detektiert<sup>90</sup>, konnte in den naszenten Zellfortsätzen (angefärbt mit Membranmarker, **Abbildung 3-27 B, D**) die Bildung fokaler Adhäsionskinasen beobachtet werden (**Abbildung 3-27 A, C**).



**Abbildung 3-27** In der Entstehung befindliche Zellfortsätze 10 (A,B) und 20 (C,D) Minuten nach Aussaat von OSC1-Zellen auf Fibronektin. (A,C) Anfärbung von phospho-FAK mit phospho-Tyrosin-Antikörper, (B,D) Membranmarker.

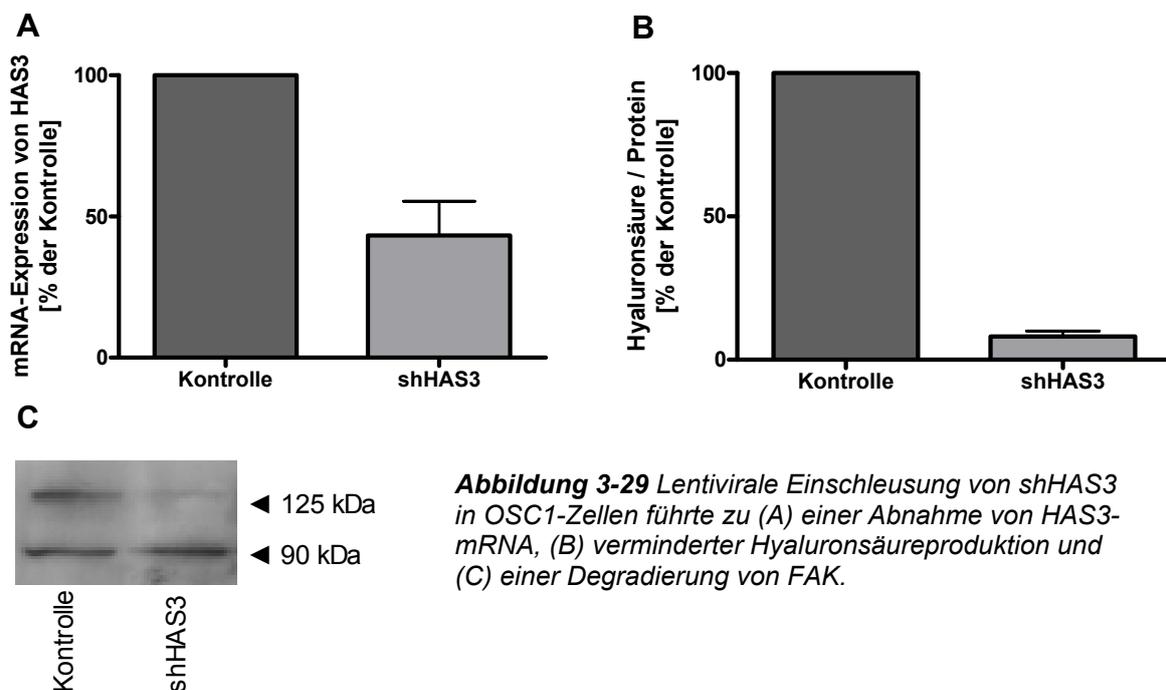
Wie in **Abbildung 3-28**, einer kleineren Vergrößerung der **Abbildung 3-27**, zu erkennen ist, führte die Behandlung mit 0,3 mM 4-MU (**Abbildung 3-28 B, D**) zu einer verminderten pFAK-Expression und einer eingeschränkten Ausbreitung der Zelle. Außerdem wurde die Entstehung der protrusiven Zellfortsätze verhindert.



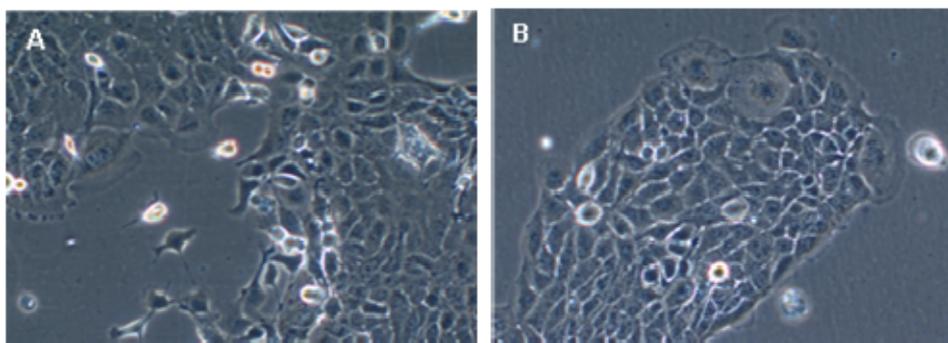
**Abbildung 3-28** Auswirkung von 4-MU (B, D) auf die Anheftung und Ausbreitung von OSC1-Zellen sowie auf die Membranfortsätze 10 (A,B) und 20 (C,D) Minuten nach Aussaat. Es ist eine deutlich verringerte Expression von pFAK wie auch eine gestörte Ausbreitung der Zellen festzustellen. Darüberhinaus wird die Entstehung der protrusiven Zellfortsätze verhindert. Grün = Anfärbung von phospho-FAK mit phospho-Tyrosin-Antikörper, Rot = Membranmarker, Blau = Kern.

### 3.9 Lentivirale Ausschaltung der Genexpression von HAS3

Um nachzuweisen, dass die beobachteten Effekte von 4-MU auf eine Abnahme der Hyaluronsäureproduktion zurückzuführen sind, wurde über ein lentivirales System eine Interferenz-RNA gegen HAS3 in die Zellen eingeschleust. HAS3 ist, wie aus **Abbildung 3-1** hervorgeht, die Hauptisoform der Hyaluronsäuresynthasen in OSC1-Zellen. Die Abnahme der HAS3-mRNA wurde über eine *Realtime*-Bestimmung verifiziert (2.16.5.2) (**Abbildung 3-29 A**). Auf Produkt-Ebene wurde die HA-Produktion über einen ELISA-ähnlichen Versuchsaufbau (2.16.5.3) (**Abbildung 3-29 B**) nachgewiesen. Die Ausschaltung von HAS3 in OSC1-Zellen führte zu einer FAK-Degradation (**Abbildung 3-29 C**) und morphologisch zu einem Phänotyp ähnlich dem unter 4-MU-Behandlung (**Abbildung 3-30**).

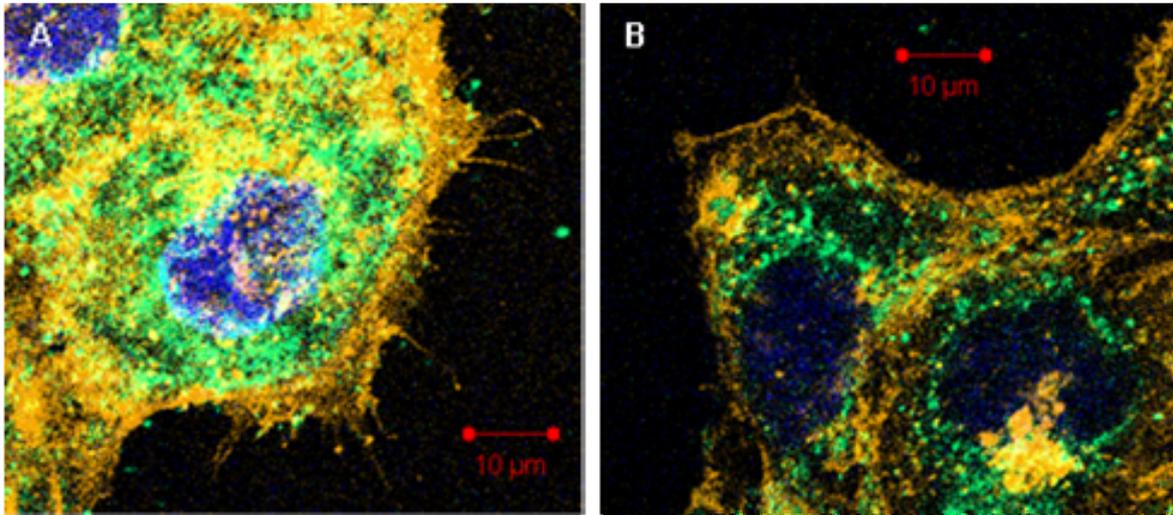


**Abbildung 3-29** Lentivirale Einschleusung von *shHAS3* in OSC1-Zellen führte zu (A) einer Abnahme von HAS3-mRNA, (B) verminderter Hyaluronsäureproduktion und (C) einer Degradierung von FAK.



**Abbildung 3-30** Auswirkung der Ausschaltung von HAS3 auf die Morphologie von OSC1-Zellen (A) Kontroll-Virus, (B) *shHAS3*-Virus. Die Zellen erscheinen flacher und finden sich in Gruppen zusammen.

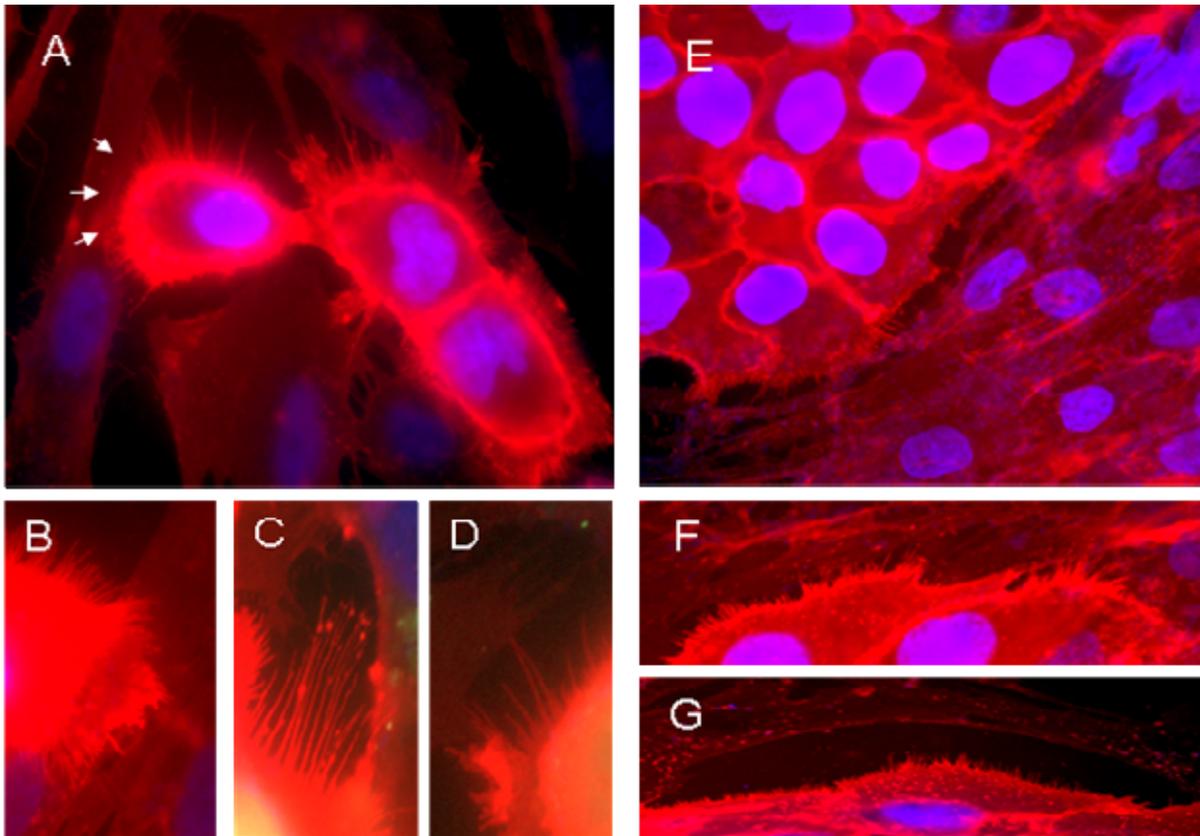
Wie in der konfokalen Aufnahme der immunzytochemischen Anfärbung auf Hyaluronsäure und Zellmembran (**Abbildung 3-31**) zu erkennen ist, führt die Ausschaltung von HAS3 in OSC1-Zellen sowohl zu einem verringerten Hyaluronsäure-Gehalt, als auch zu einer Auflösung der Zellfortsätze.



**Abbildung 3-31** Auflösung der Zellfortsätze und Verringerung des Hyaluronsäure-Gehaltes durch Behandlung der OSC1-Zellen mit HAS3-Interferenz-RNA. (A) Kontrolle, (B) shHAS3. Grün = Hyaluronsäure, Orange = Membranmarker, Blau = Kerne.

### 3.10 Invasives Potential der Zellfortsätze

Um das Invasionspotential der hier beschriebenen Zellfortsätze zu untersuchen, wurde eine Mischkultur im Verhältnis 1:4 aus OSC1-Zellen und Fibroblasten, stellvertretend für Stromazellen, vorgenommen (**Abbildung 3-32**). Da ein Membranmarker auf Weizenkeim-Agglutinin-Basis verwendet wurde, sind die Tumorzellen aufgrund des hohen Gehaltes an N-Azetylneuraminsäure in der Membran intensiver gefärbt als die Fibroblasten<sup>91</sup>. In diesem Versuchsaufbau konnte beobachtet werden, dass die Tumorzellen keine Kontaktinhibierung zeigten, wie sie für nicht transformierte Zellen typisch ist, sondern bei der Annäherung an einen Fibroblasten unter diesen hindurchwanderten (**Abbildung 3-32 B**) oder diesen zurückdrängten (**Abbildung 3-32 A Pfeile**).

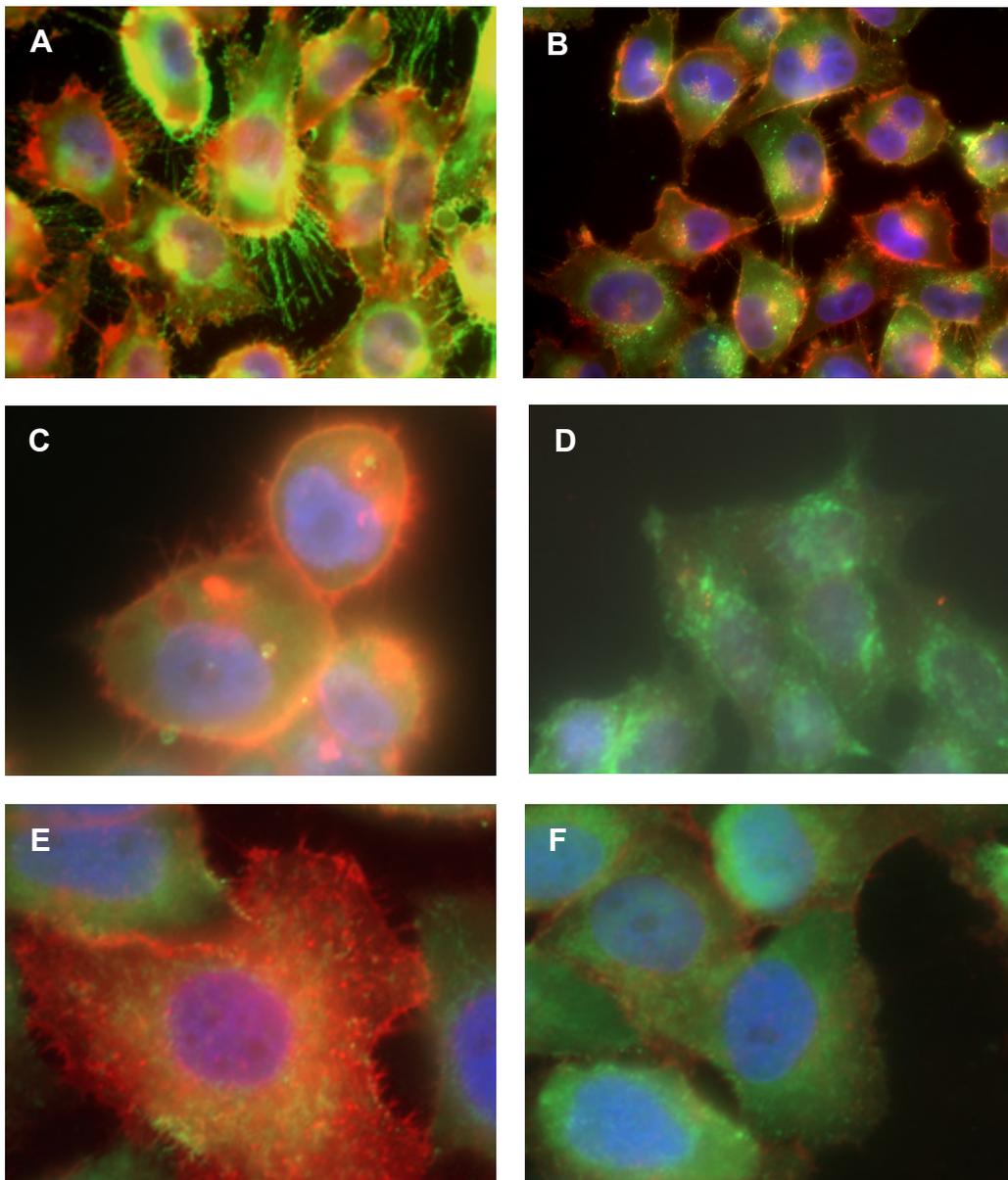


**Abbildung 3-32** Misch-Kultur zwischen OSC1-Zellen und Fibroblasten stellvertretend für Stromazellen. Die Zellen wurden mit Membranmarker angefärbt. (A, B, C, D) OSC1-Zellen (stark rot) zeigen eine große Anzahl an Zellfortsätzen, die Fibroblasten eindrückten (A Pfeile), eine Bewegung der Krebszelle über und unter der Stromazelle hindurch vermittelten (B), den Extrazellärraum ausfüllten (C) und die Zellmembran des Fibroblasten abtasteten (D). Unter vierundzwanzigstündiger 4-MU-Behandlung verkürzten sich die protrusiven Strukturen (E, F, G). Auch eine Kontaktinhibierung wurde wieder hergestellt (E, F). (G) Trotz Raumangebots wurde der Extrazellulärraum nicht mehr durch die Zellfortsätze ausgefüllt.

Des Weiteren konnten sondierende protrusive Strukturen (**Abbildung 3-32 D**) gezeigt werden, die an einigen Stellen den Extrazellulärraum zwischen Krebszellen und Fibroblasten ausfüllten (**Abbildung 3-32 C**). Die Behandlung mit 4-MU führte zu einer Größenreduktion der Zellfortsätze (**Abbildung 3-32 E, F, G**). Außerdem waren keine Überlagerungen von OSC1-Zellen und Fibroblasten mehr zu erkennen (**Abbildung 3-32 E, F**). Wie in **Abbildung 3-32 G** zu sehen ist, wurden auch die Zwischenräume zwischen den Zellen nicht mehr durch Zellfortsätze ausgefüllt. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass sich eine verstärkte Bildung von Zellfortsätzen an den Stellen zeigte, an denen Krebszellen und Fibroblasten aufeinander trafen.

### 3.11 Ähnliche Zellfortsätze in anderen Arten von Krebszellen

Ähnliche Zellfortsätze wurden ebenfalls in melanomatösen BLM Zellen gefunden und konnten auch hier mit 4-MU zerstört werden (**Abbildung 3-33 A, B**). In geringerem Maße war dies auch in der hepatokarzinomalen Hep G2 Linie (**Abbildung 3-33 C, D**) und der adenokarzinomalen ACC China Linie der Fall (**Abbildung 3-33 E, F**).



**Abbildung 3-33** Vorkommen protrusiver Strukturen (A, C, E) und deren Auflösung unter einer 24-stündigen Behandlung mit 0,3 mM 4-MU (B, D, F) in verschiedenen Krebszelllinien. BLM Melanom (A, B), Hep G2 Hepatokarzinom (C, D), ACC China Adenokarzinom (E, F).

## 4 Diskussion

Im Folgenden sollen die Effekte von 4-MU auf den Phänotyp von OSC1-Zellen näher untersucht werden. Die offensichtlichste Auswirkung einer Behandlung mit 4-MU stellt die morphologische Veränderung der Zellen dar (**Abbildung 3-6**). Eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Zellform spielen die verschiedenen Arten an Haftverbindungen, die die Zelle mit der Umgebung verbinden und die direkt mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen. Diese werden in Kapitel 4.1 vorgestellt. Von den in diesem Kapitel genannten mit dem Zytoskelett assoziierten Haftverbindungen scheint dem fokalen Adhäsionskomplex eine besondere Funktion in der Vermittlung der 4-MU-Wirkungen zuzukommen. So konnten unter Behandlung mit 4-MU sowohl eine Degradation der fokalen Adhäsionskinase (FAK) als auch eine Abnahme der Zahl der fokalen Adhäsionskomplexe beobachtet werden. Aus diesem Grund werden die fokalen Adhäsionskomplexe zusammen mit deren Hauptmolekül Integrin und FAK als wichtigstem Vermittler der intrazellulären Integrinwirkungen in Kapitel 4.2 näher erläutert. Dort werden auch die nachgeschalteten Signaltransduktionswege von FAK und deren Bedeutung in der Karzinogenese erörtert. Die Degradation der FAK stellt einen zentralen Prozess dar, der über die Auflösung der fokalen Adhäsionskomplexe extrazelluläre und, über die Herabregulierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege wie den ERK- und AKT-Signalkaskaden, intrazelluläre Auswirkungen hat. Aus diesem Grund soll die Erklärung der 4-MU-induzierten Wirkungen ausgehend von der Degradation von FAK besprochen werden. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, wie eine verminderte Hyaluronsäureproduktion eine Degradierung von FAK auslösen könnte (Kapitel 4.3) und welcher unmittelbare Mechanismus zur Degradation der FAK führt (Kapitel 4.4). Im Anschluss werden mögliche Auswirkungen der FAK-Degradation auf die Zellform und die MMP9 (Matrix Metalloproteinase 9)-Expression diskutiert (Kapitel 4.5). Auch von der FAK-Degradation unabhängige Mechanismen, wie die direkte hyaluronsäureabhängige Beeinflussung von ERK werden untersucht (Kapitel 4.6). Den Abschluss des ersten Teils der Diskussion bildet eine Zusammenfassung der Hemmstoffe der Hyaluronsäurewirkungen und ihres Einflusses auf Zellmorphologie und FAK-Degradierung (Kapitel 4.7).

Der zweite Teil der Diskussion beschäftigt sich mit den in OSC1-Zellen stark vertretenen protrusiven Zellfortsätzen und deren Rückbildung unter 4-MU. Es wird eine Übersicht aktin-basierter Strukturen gegeben (Kapitel 4.8) und die in dieser Arbeit beschriebenen Zellfortsätze werden den in der Literatur definierten Strukturen zugeordnet (Kapitel 4.9). Außerdem soll versucht werden, ihre Funktion für die Motilität und Invasion der OSC1-Zellen abzuschätzen. Auch der Mechanismus der Auflösung unter einer Behandlung mit 4-MU ist Gegenstand der Untersuchung (Kapitel 4.10).

Abschließend soll aufgrund der Daten der vorliegenden Arbeit ein kurzer Ausblick auf eine mögliche Verwendung von 4-MU in der Krebstherapie gegeben werden und die Ergebnisse der Arbeit werden kurz zusammengefasst.

## 4.1 Die Verankerung der Zelle im Gewebe

Der Zusammenhalt des Gewebes wird über zwei Funktionsprinzipien aufrechterhalten: Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Es existieren vier Hauptgruppen von zytoskelett-assoziierten Haftverbindungen, von denen zwei mit der Matrix interagieren, während die anderen beiden Zell-Zell-Interaktionen vermitteln<sup>92</sup>:

### Zell-Zell-Verbindungen

- **Gürteldesmosomen** (Adhäsionsgürtel, *Zonula adherens*, *adhesion belt*) bestehen extrazellulär aus Cadherinen, Kalzium-abhängigen Verbindungsmolekülen, die intrazellulär über die assoziierten Proteine Catenin, Vinculin und  $\alpha$ -Aktinin mit filamentösen Aktin-Bündeln des Zytoskeletts verbunden sind.
- **Punkt-desmosomen** (*Macula adherens*) bestehen ebenfalls aus Cadherinen, weisen aber auf der Innenseite der Plasmamembran eine Plaque-Struktur aus einer anderen Gruppe an assoziierten Proteinen auf (die Catenine Desmoglein und Desmopollin sowie Plakoglobin und Desmoplakin), an die sich in epitheliale Gewebe Intermediär-Filamente aus Keratin anlagern.

### Zell-Matrix-Verbindungen

- Die **Fokalen Adhäsionskomplexe** (Fokale Kontakte, *adhesion plaques*) vermitteln über transmembranäre Integrine (siehe 4.2.1) die Anheftung der Zelle an Extrazellulärmatrixmoleküle wie z.B. Fibronectin und Kollagen, die spezifische Liganden der Integrine darstellen. Intrazellulär bildet sich ein fokaler Adhäsionskomplex, der unter 4.2 näher besprochen wird. Dieser bildet eine Verbindung zwischen den Integrinen und dem filamentösen Aktin des Zytoskeletts. Integrine können über ihre Bindung an die oben genannten Liganden der Extrazellulärmatrix auch als Rezeptoren fungieren, wobei der fokale Adhäsionskomplex die Signaltransduktion an nachgeschaltete Zielstrukturen vermittelt.

- **Hemidesmosomen** haben wie fokale Adhäsionskomplexe einen extrazellulären Integrin-Anteil und erscheinen intrazellulär wie Punkt-desmosomen, d.h. sie koppeln über einen Plaque aus assoziierten Proteinen an Intermediär-Filamente aus Keratin.

Zusammenfassend läuft bei den genannten Interaktionsmolekülen die Zell-Matrix-Verbindung immer Integrin-abhängig ab, während die Zell-Zell-Verbindung Cadherin-vermittelt ist. Es findet entweder eine Verknüpfung mit intermediären Keratin-Filamenten oder mit filamentösen Aktin-Bündeln des Zytoskeletts statt.

Daneben existieren noch eine Reihe von nicht mit dem Zytoskelett in Verbindung stehenden Adhäsionsmolekülen, die im Falle einer Zell-Matrix-Verbindung als Substrat-Adhäsionsmoleküle („SAMs“) und bei einem Zell-Zell-Kontakt als Zell-Adhäsionsmoleküle („CAMs“) bezeichnet werden.

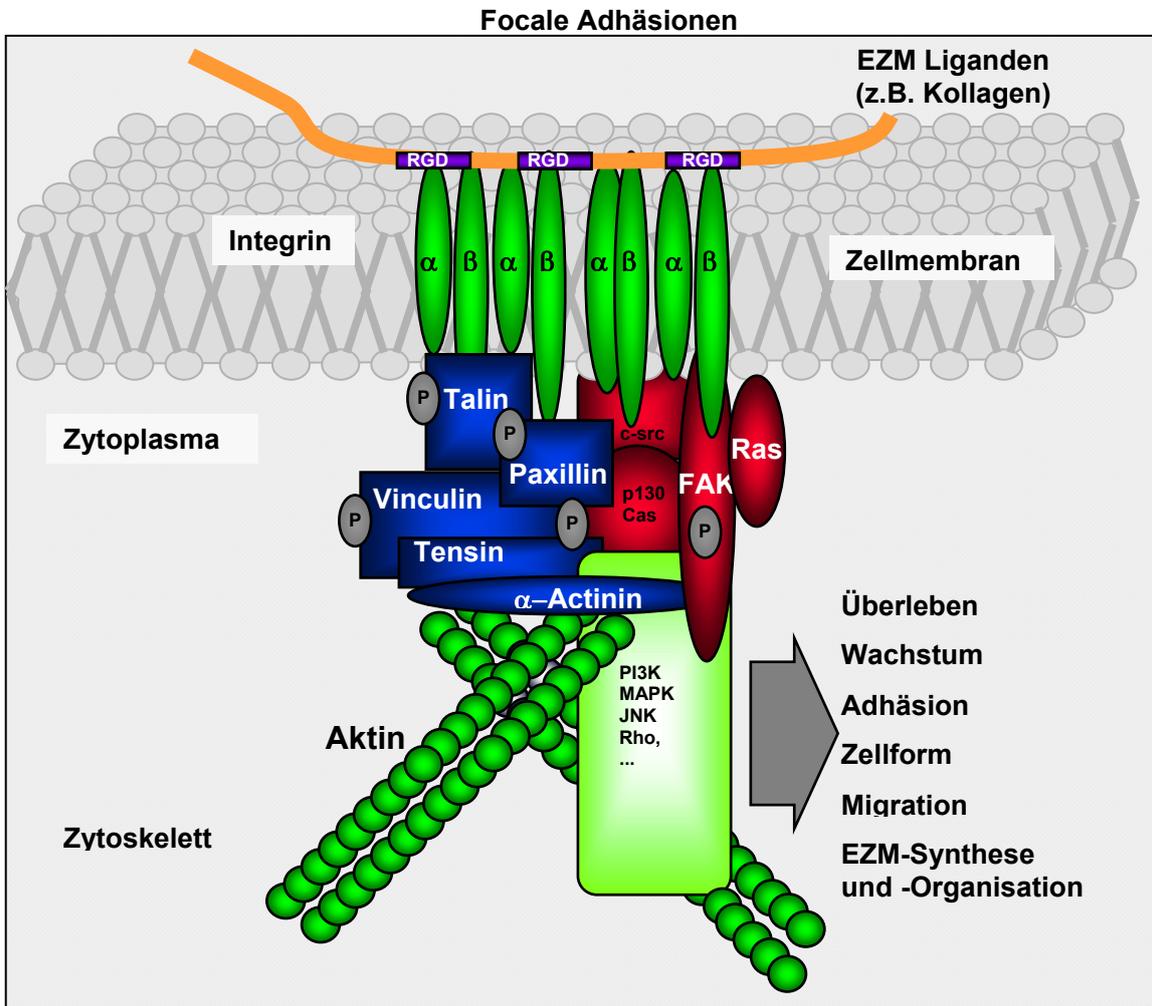
Die beschriebenen Arten von Zell-Verbindungen werden durch molekulare Bausteine hergestellt, die alle einer von vier Familien an Zell-Adhäsions-Molekülen entstammen<sup>93</sup>.

Dies sind einerseits die **Selektine**, die heterotypische Zell-Zell-Verbindungen ausbilden. Die wichtigsten Mitglieder dieser Familie werden nach ihrem Zelltropismus benannt, L- (leukozytäre), E- (endotheliale) und P- (Plättchen) Selektine. Sie binden intrazellulär an Aktin und extrazellulär an bestimmte Glykoproteine wie *P-Selektin Glykoprotein Ligand 1* (PSGL-1) und das *kutane Lymphozyten Antigen* (CLA). Andererseits ist hier die **Ig-CAM**-Familie zu nennen. Sie besteht unter anderem aus N-CAM (neuronaler Häufung), V-CAM (vaskuläre Häufung) und M-CAM (melanom-assoziiert). Die Mitglieder der Ig-CAM-Familie bilden heterotypische Verbindungen mit Integrinen und Selektinen benachbarter Zellen aus.

Die Familie der **Cadherine** findet sich als Hauptstruktur der Gürtel- und Punkt-desmosomen und bildet enge homotypische Zell-Zell-Verbindungen aus. Auch Cadherine unterteilen sich nach ihrem ursprünglichen Fundort in N- (neurale), P- (plazentare), R- (retinale), B- (*brain*), E- (epitheliale) und VE- (vaskulär endotheliale) Cadherine. Intrazellulär binden sie  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenine, die schließlich die Verbindung zum Zytoskelett herstellen. Alle hier erwähnten Moleküle vermitteln ihre Funktion kalzium-abhängig.

Die vierte Familie umfasst die **Integrine** und wird genauer in Kapitel 4.2.1 besprochen.

## 4.2 Der fokale Adhäsionskomplex



**Abbildung 4-1** Fokaler Adhäsionskomplex (Modifiziert nach *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 163/II, J.W. Fischer, p. 54)<sup>1</sup>. Dargestellt sind die membranständigen Integrine und die im fokalen Adhäsionskomplex vereinigten assoziierten nachgeschalteten Proteine. Diese sind grob in Bestandteile des Zytoskeletts (blau) und Tyrosinkinasen (rot) eingeteilt. Im grünen Kasten sind einige nachgeschaltete Signalproteine zusammengefasst.

Ein fokaler Adhäsionskomplex besteht aus einer Anhäufung integrin-assoziiierter intrazellulärer Proteine (**Abbildung 4-1**)<sup>1</sup>. Diese lassen sich grob in Bestandteile des Zytoskeletts und die Tyrosinkinasen unterscheiden. Hinzu kommen Serin / Threoninkinasen (Proteinkinase C), Modulatoren von kleinen GTPasen, Tyrosinphosphatasen und andere Enzyme (Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Zysteinprotease Calpain). Die wichtigsten mit Integrinen assoziierten Bestandteile des Zytoskeletts

sind Tensin, Vinculin, Paxillin,  $\alpha$ -Actinin und Talin. Diese sind in der Abbildung blau markiert. Sie erfüllen die Aufgabe von Adapter-Proteinen, die entweder eine direkte Verbindung zwischen Integrin und Aktinfasern herstellen (Talin) oder z.B. über die FAT-Bindestelle von FAK (siehe 4.2.2) eine indirekte Verbindung zwischen Integrin und Aktinfasern etablieren (Paxillin und Talin). Zusätzlich führt z.B. eine Bindung von Talin an Integrin zu dessen Aktivierung (siehe 4.2.1, **Abbildung 4-3**).

Der fokale Adhäsionskomplex bildet das Bindeglied zwischen der integrin-vermittelten Haftung an ein Substrat der Matrix und dem Zytoskelett. Hinzu kommt die Weiterleitung extrazellulärer Signale an die intrazellulären Signaltransduktionswege.

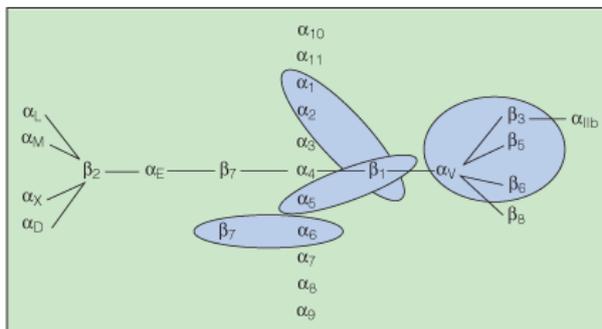
Die im fokalen Adhäsionskomplex versammelten Tyrosinkinase Ras, c-Src, FAK und das Adaptermolekül p130 Cas sind in der Abbildung rot markiert. Die Tyrosinkinase ergänzen die fehlende Tyrosinkinase-Aktivität der Integrine. Diese Signalmoleküle sind entweder auf den fokalen Adhäsionskomplex beschränkt (FAK) oder werden z.B. mit Tyrosin-Kinase-Wachstumsrezeptoren geteilt (Src), was zu einer Synergie zwischen Integrin und Wachstumsrezeptor führt<sup>93</sup>. Ras und Src steuern wichtige Proliferations- und Überlebens-Signalwege und sind bekannte Proto-Onkogene.

Die beiden wichtigsten Komponenten der fokalen Adhäsionskomplexe, Integrin und FAK, werden im Folgenden genauer besprochen:

#### 4.2.1 Integrine, Kontaktstellen zur Extrazellulärmatrix

Die Integrine sind eine große und stark differenzierte Familie von Adhäsionsrezeptoren. Aus diesem Grund sind die unterschiedlichen Signalwege, die durch Integrine aktiviert werden, äußerst heterogen. Viele der elementaren Integrinspezifischen Signalwege, wie Zell-Zyklus-Kontrolle und Apoptose-Inhibition finden ubiquitär statt, einige dagegen nur in ganz speziellen Zelltypen, so z.B. die Zelldifferenzierung.

Strukturell gesehen handelt es sich bei Integrinen um große Glykoproteine (MG ca. 300 kDa), die aus einer Gruppe von nicht-kovalent verknüpften, transmembranären  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammengesetzt sind. Auf diese Weise bilden sich 24 verschiedenartig zusammengesetzte Heterodimere mit einer redundanten aber spezifischen Ligandenbindung (**Abbildung 4-2**)<sup>94</sup>.



**Abbildung 4-2** Die 24 bisher gefundenen  $\alpha\beta$  Integrin Heterodimere. In den Ovalen stehen die in der Tumorgenese bedeutsamen Kombinationen. Aus Moschos, *Integrins and Cancer*, *Oncology*, 2007;21(9 Suppl 3):13-20.

Das Vorkommen dieser verschiedenen Heterodimere, mit einer Vielfalt von Liganden und nachgeschalteten Signaltransduktionswegen ist der Grund für die erwähnte Funktionsdiversität der Integrine, die diese Familie zu der facettenreichsten unter den Zell-Adhäsionsmolekülen macht.

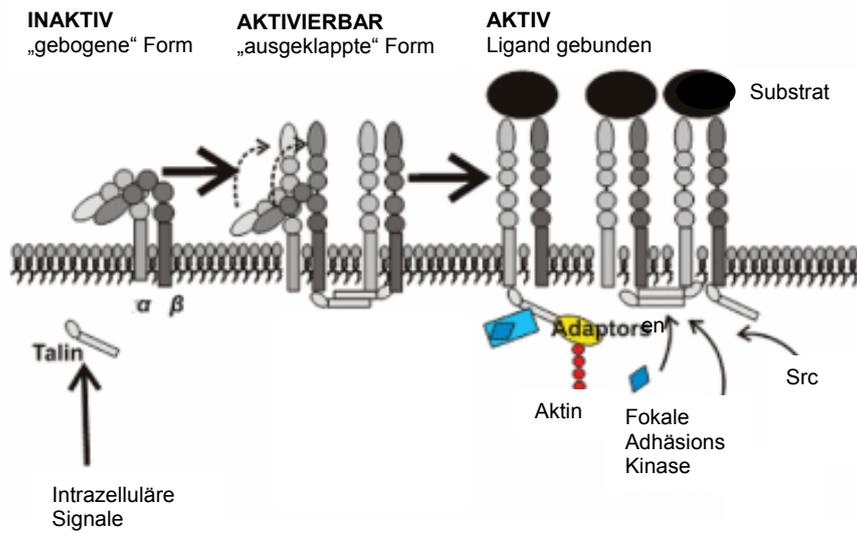
Im Gegensatz zu den unter 4.1 beschriebenen Zell-Adhäsions-Familien benötigen Integrine nicht nur wie diese Kalzium-Ionen zur Bindung sondern auch Magnesium-Ionen.

Verschiedene in der Extrazellulärmatrix vorkommende Liganden von Integrinen sind z.B. Laminin, Kollagen, Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin. Meist kann ein Ligand an mehrere Integrin-Heterodimere binden. Im Fall des Fibronektins ist dies hauptsächlich  $\alpha_5\beta_1$ , zusätzlich aber noch mindestens neun weitere Heterodimere<sup>95</sup>.

Aber auch heterotypische Verbindungen mit anderen Zellen werden über Integrine geknüpft, so z.B. mit der erwähnten Familie der Ig-CAMs, aber auch selten mit E-Cadherin. Integrine binden selektiv an die RGD-Sequenz (Ein-Buchstaben-Kodierung der drei beteiligten Aminosäuren Arginin, Glyzin und Asparaginsäure), die besonders in Proteinen der extrazellulären Matrix vorkommt; so zeigen Fibronektin und Vitronektin dieses Epitop-Motiv. Es existieren aber auch viele Liganden der Integrine ohne dieses Motiv, so z.B. CAMs, Kollagene und Laminin.

Die Bindung der erwähnten Liganden an Integrine führt zu deren Dimerisierung und zur Rekrutierung von Signalmolekülen und Aktinfilamenten am zytoplasmatischen Ende der Integrine. Fokale Adhäsionskomplexe gewährleisten eine gerichtete Substratbindung und Lokalisation von Aktinfilamenten und Signalmolekülen<sup>96,97</sup>. Diese Prozesse sind für die gerichtete Zellmigration, die Polarität der Zellen sowie für die Zellproliferation und das Überleben der Zellen von essentieller Wichtigkeit. Die Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett und den Integrinen ist dynamisch und durch verschiedene Faktoren sogar innerhalb einer Zelle unterschiedlich reguliert. Bei migrierenden Zellen lässt sich beobachten, wie sich am Lamellipodium in Wanderungsrichtung ständig neue fokale Adhäsionskomplexe bilden und Aktin rekrutiert wird. Am gegenüberliegenden Ende lösen sich Integrine von der Extrazellulärmatrix, das gebildete Aktinzytoskelett verschwindet und die fokalen Adhäsionskomplexe werden degradiert<sup>98,99</sup>.

Eine wichtige Besonderheit der Integrin-Rezeptoren ist die Tatsache, dass sie nicht nur eine von außen nach innen gerichtete Signalverarbeitung durchführen, sondern es auch durch intrazelluläre Signale, wie z.B. eine Anlagerung von Talin, zu einer Aktivierung oder Inaktivierung des extrazellulären Teils der Integrine kommen kann<sup>100</sup>. (**Abbildung 4-3**).

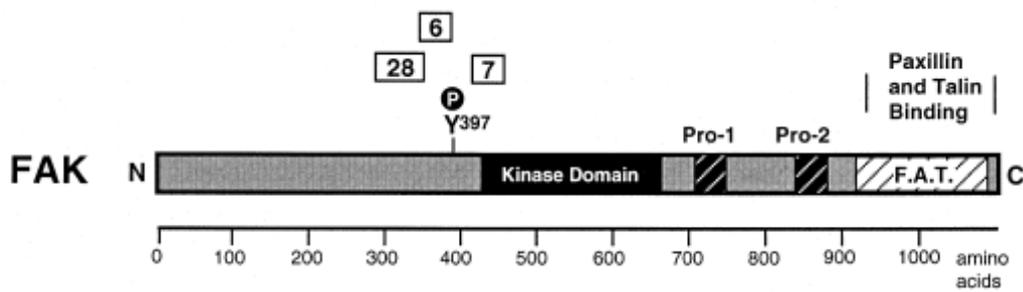


**Abbildung 4-3** Aktivierung und Deaktivierung von Integrin über z.B. eine Anlagerung von Talin. Aus Moschos, *Integrins and Cancer*, *Oncology* 2007;21(9 Suppl 3):13-20.

Im Zusammenhang mit der Karzinogenese konnte durch eine Vielzahl von Publikationen belegt werden, dass Integrine eine Schlüsselrolle bei der Steuerung onkogener Prozesse wie Migration und Invasion, Metastasierung und Angiogenese sowie Apoptose einnehmen.

## 4.2.2 Die fokale Adhäsionskinase (FAK), ein zentrales Molekül in der integrin-vermittelten Signaltransduktion

Viele Komponenten der fokalen Adhäsionskomplexe sind Substrate von Tyrosinkinase, einschließlich der Tyrosinkinase selbst. Eine der wichtigsten "nicht-Rezeptor"-Tyrosinkinase der fokalen Adhäsionskomplexe ist die fokale Adhäsionskinase (FAK).



### Alternativ gespleißtes FAK Protein

#### FRNK

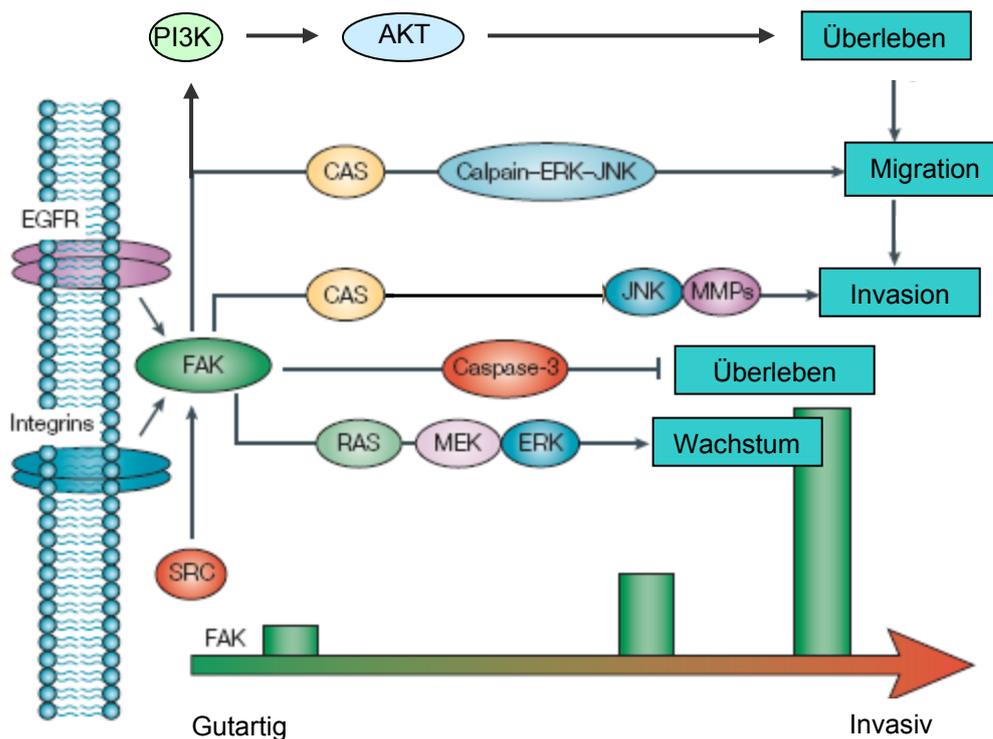


**Abbildung 4-4** Die Struktur der fokalen Adhäsionskinase (FAK). Die beiden wichtigsten Domänen sind die Kinase-Domäne, die die Phosphorylierung der nachgeschalteten Proteine auslöst und die FAT-Domäne (focal adhesion targeting), mit der FAK an Paxillin und Talin bindet. Aus Schlaepfer, *Signaling of focal adhesion kinase*, *Prog Biophys Mol Biol* (1999), Vol. 71, pp. 435-478.

In **Abbildung 4-4** ist der strukturelle Aufbau von FAK zu erkennen. Am C-terminalen Ende von FAK befindet sich die sogenannte FAT-Domäne (*focal adhesion targeting*), die für die indirekten Interaktionen mit dem zytoplasmatischen Ende der Integrine verantwortlich ist. Diese Domäne enthält Bindungsstellen für die mit Integrin assoziierten Proteine Paxillin und Talin<sup>101,102</sup>. Die zentrale Kinase-Region gilt als hochkonserviert und besitzt eine wichtige Autophosphorylierungsstelle an Tyrosin-397, die für die Aktivität von FAK eine besondere Rolle spielt. Eine Spleiß-Variante von FAK stellt die alleinige Expression der C-terminalen Domäne von FAK, genannt FRNK (*FAK related non-kinase*) dar. FRNK kann als endogener, dominant negativer Inhibitor von FAK fungieren<sup>103,104</sup>.

Über seine verschiedenen nachgeschalteten Signaltransduktionswege vermittelt FAK eine Vielzahl wichtiger Zellvorgänge, wie Migration, Proliferation und Überleben, die besonders in der Tumorgenese eine große Rolle spielen<sup>105,106</sup> und daher im Folgenden näher betrachtet werden:

Nach einer Rezeptordimerisierung von Integrin oder des EGF-R (epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor) erfolgt die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK), die selber keinen Rezeptor darstellt, sondern über Konformationsänderungen aktiviert wird und durch Phosphorylierung weitere Signalwege aktiviert. In **Abbildung 4-5** sind die für die Karzinogenese wichtigsten nachgeschalteten Transduktionswege von FAK dargestellt.



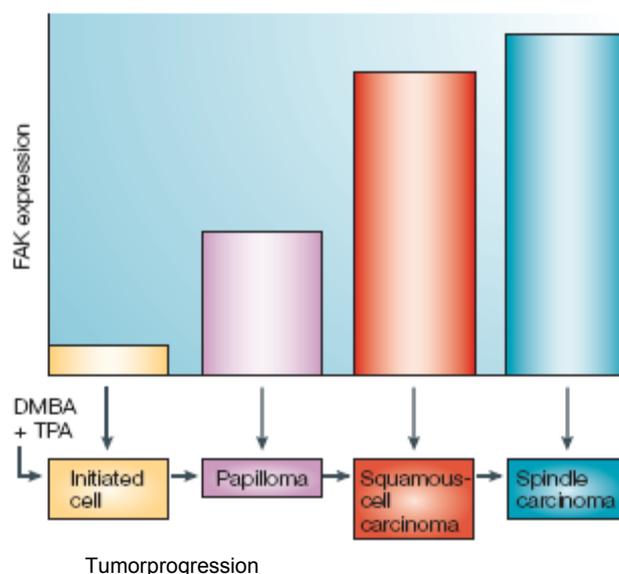
**Abbildung 4-5** Die Signaltransduktionswege der fokalen Adhäsionskinase (FAK). Genauere Beschreibung im Text. Modifiziert nach McLean, *Nat Rev Cancer* (2005) Vol.5 pp.105-115.

Das Zellwachstum wird über den Ras-ERK-Signalweg reguliert (in der Abbildung unten). Die beteiligten Proteine kommen dabei größtenteils aus der Familie der MAP-Kinasen (mitogen-aktivierte Kinasen). Dabei aktiviert FAK indirekt das Ras-Protein, ein Proto-Onkogen, das für eine kleine GTPase kodiert. Ras phosphoryliert Raf (eine proto-onkogene Proteinkinase), die wiederum MEK (MAPK-ERK-Kinase) phosphoryliert. MEK schließlich aktiviert ERK über eine weitere Phosphorylierung. Um der Funktion der einzelnen Proteine in der Signaltransduktionskaskade Rechnung zu tragen, wird Raf auch als MAP-Kinase-Kinase-Kinase, MEK als MAP-Kinase-Kinase und ERK als MAP-Kinase bezeichnet. Das Beispiel zeigt den

typischen Fall eines Signaltransduktionsweges, in dem ein Faktor den nächsten über eine Phosphorylierung aktiviert. Das Ziel solcher Kaskaden stellen meist Transkriptionsfaktoren dar, die in den Zellkern transloziert werden und dort die Ablesung einzelner Gene veranlassen.

Eine Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (in der Abbildung oben) führt über eine Phosphorylierung von AKT (Proteinkinase B) zur Aktivierung einer Vielzahl von Zielstrukturen, die unter anderem eine Apoptose-Resistenz hervorrufen können und indirekt für eine erhöhte Migration und Proliferation von Tumorzellen verantwortlich sind. Als Gegenspieler sorgt der Caspase-3 vermittelte Signalweg für eine verstärkte Apoptose.

Die über CAS (p130cas, CRK assoziiertes Substrat) und JNK (c-Jun N-terminale Kinase) (in der Abbildung Mitte oben) ablaufenden Transduktionswege tragen zu einer erhöhten Migration und Invasion der Krebszelle bei.



**Abbildung 4-6** Mit steigendem Grad an Malignität, findet sich auch eine verstärkte Expression von FAK. Aus McLean, *The Role of FAK in Cancer*, Nat Rev Cancer (2005), Vol. 5, pp. 505-515.

All diesen Signaltransduktionswegen ist die übergeordnete Aktivierung durch FAK gemeinsam. Wie aus **Abbildung 4-5** und **Abbildung 4-6** ersichtlich, ist die Tumorprogression folglich auch oft mit einer Erhöhung der FAK-Expression vergesellschaftet<sup>106</sup>. Dies zeigt die Schlüsselposition dieses Proteins in der Tumor-Exazerbation. Weitere Faktoren, die in transformierten Zellen konstitutiv überaktiv gefunden werden, sind das kleine G-Protein Ras<sup>107,108</sup> und die Tyrosin-Kinase Src<sup>109,110</sup>, die deshalb auch als Proto-Onkogene bezeichnet werden.

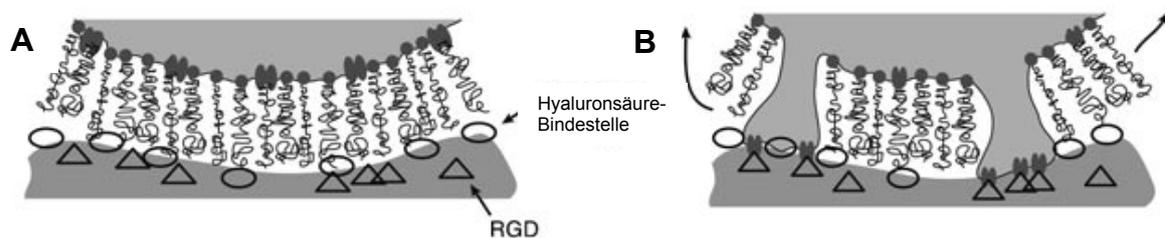
### **4.3 Mögliche Mechanismen der 4-MU induzierten FAK-Degradation**

Wie durch Immuno-Blot-Analysen festgestellt wurde, führte eine Behandlung mit 4-MU zu einer signifikanten FAK-Degradation (Kapitel 3.4) und wahrscheinlich in deren Folge zu einer im Lichtmikroskop wahrnehmbaren Veränderung der Zellmorphologie. Diese Beobachtung impliziert eine Abhängigkeit der Stabilität der fokalen Adhäsionskomplexe von dem Vorhandensein einer kritischen Menge an Hyaluronsäure im Extra- bzw. Intrazellulärraum der Zelle. Diese Verbindung zwischen Hyaluronsäure- und Integrinsystem könnte auf folgenden Mechanismen beruhen:

#### **4.3.1 Abhängigkeit der Integrin-vermittelten Adhäsion von der hyaluronsäure-vermittelten Adhäsion**

Cohen *et al.*<sup>111</sup> haben den Übergang von hyaluronsäure- zu integrinvermittelter Adhäsion untersucht. Sie beobachteten, dass die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen eine initiale hyaluronsäure-abhängige Adhäsion an das Substrat voraussetzt und es erst in dessen Folge zur Ausbildung der stabileren fokalen Adhäsionskomplexe kommt. In diesem Zusammenhang konnten sie die Existenz einer Hyaluronsäure-Bindestelle nachweisen, die auf einer Vielzahl von Substraten und Materialien existiert<sup>112</sup>. Diese wird von den Autoren, zur Unterscheidung von Rezeptoren und anderen membranständigen Bindeproteinen, "Molekulare Bindungsstelle" genannt. Sie unterscheidet sich von der Integrin-vermittelten Adhäsion durch ein zwar schwächeres, aber aufgrund der geringeren Selektivität, multivalenteres Bindungspotential. So kommen Hyaluronsäure-Bindungsstellen auf Glas und anderen kristalloiden Strukturen vor. Anhand der Anheftung an die verschiedenen Enantiomeren eines Calciumtartrat-Kristalles, konnte die Chiralität dieser Bindungsstellen nachgewiesen werden. Die Autoren beschreiben den Vorgang der konzertierten hyaluronsäure- und integrin-vermittelten Adhäsion als einen Prozess in zwei Schritten:

Im ersten Schritt werden über Hyaluronsäureketten, die an den hyaluronsäurebindenden Proteinen CD44 oder HYAL2 in der Zellmembran verankert sind, schwache Bindungen zu Hyaluronsäure-Bindungsstellen auf einem Substrat der Matrix geknüpft (**Abbildung 4-7 A**). Darauf erfolgt durch eine Umlagerung der Hyaluronsäureketten und durch ein Vorstülpen der Zellmembran eine starke Bindung von transmembranärem Integrin an die RGD-Sequenzen (siehe 4.2.1) verschiedener Matrix-Proteine (**Abbildung 4-7 B**). Der Hyaluronsäure kommt also eine adjuvante Aufgabe in der integrin-vermittelten Matrix-Adhäsion zu.



**Abbildung 4-7** Die beiden Schritte der Hyaluronsäure-vermittelten Adhäsion. (A) Im ersten Schritt werden durch, über CD44 oder HYAL2 in der Zellmembran verankerte, Hyaluronsäureketten schwache Verbindungen zu Hyaluronsäure-Bindungsstellen auf einem Substrat der Matrix geknüpft. (B) Darauf erfolgt durch eine Konformitätsverlagerung und ein Vorstülpen der Zellmembran eine starke Bindung von transmembranärem Integrin an die RGD-Sequenzen verschiedener Matrix-Proteine. Aus Cohen, *ChemBioChem*, Vol. 5, Issue 10, pp. 1393-1399.

Vor diesem Hintergrund sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dahingehend zu interpretieren, dass der durch 4-MU ausgelöste Verlust an perizellulärer Hyaluronsäure zu einer Destabilisierung der Bindung von fokalen Adhäsionskomplexen führt, die deren Auflösung und somit eine Degradation von FAK nach sich zieht. Die Folge ist ein in der Aktivität vermindertes ERK- und AKT-System (siehe 4.2.2), das zu den beobachteten Migrations- und Proliferationsdefiziten führen würde.

#### **4.3.2 Möglicher Einfluß der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM auf die Degradierung von FAK**

Eine weitere Erklärung für die Degradation der FAK unter Behandlung mit 4-MU könnte im Bereich der Signaltransduktionswege der wichtigsten Hyaluronsäurerezeptoren, CD44 und RHAMM zu finden sein. Aufgrund des Wirkungsmechanismus führt die Hemmung der Hyaluronsäureproduktion durch 4-MU sowohl zu einer extrazellulären als auch zu einer intrazellulären Hyaluronsäureverarmung. Dieser Umstand unterscheidet 4-MU von anderen Substanzen, die Hyaluronsäure-Bindungen stören, wie oligomere Hyaluronsäure<sup>30,33,34,113</sup>, lösliches Hyaluronsäurebindeprotein (HABP)<sup>34,63,114,115</sup>, lösliches CD44<sup>63,114</sup> und Pep-1<sup>89</sup>, einem Peptid, das Hyaluronsäure von seinen Bindungsstellen verdrängt. Diese Substanzen greifen alle von der extrazellulären Seite in den Hyaluronsäure-Stoffwechsel ein. Die Tatsache, dass die Effekte von 4-MU auf die FAK-Degradation und die Morphologie nicht mit einem blockierenden Antikörper gegen den membranständigen Hyaluronsäurerezeptor CD44 nachgestellt werden konnten, spricht für eine Beteiligung intrazellulärer Mechanismen. Da RHAMM sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche zu finden ist, könnten die beobachteten Effekte auf eine Beteiligung von RHAMM weisen. Hall *et al.*<sup>43</sup> berichten, dass eine transiente Stimulation von Zellen mit Hyaluronsäure oder geringen Konzentrationen an (unter diesen Umständen aktivierenden) anti-RHAMM-Antikörpern zu einer FAK-Phosphorylierung und einer vermehrten Bildung von fokalen Adhäsionen führt, die nachgeschaltet einen höheren Umsatz an fokalen Adhäsionen zur Folge haben. In diesem Zusammenhang denkbar ist die Hypothese, dass eine Störung des stimulierenden Effektes von HA auf RHAMM durch 4-MU-Behandlung in Bezug auf die fokalen Adhäsionen ein Ungleichgewicht zwischen auf- und abbauenden Prozessen mit stärkerer Betonung des katabolen Weges erzeugt. Diese Verschiebung würde schließlich in einer vermehrten Degradation von FAK und der fokalen Adhäsionen im Ganzen resultieren.

#### 4.4 Calpain-Abhängigkeit der FAK-Degradation

Um festzustellen, auf welchem Weg die Degradation der FAK ausgelöst wird, wurde der Versuch unternommen, den Effekt von 4-MU, über die Beeinflussung bekannter an einer Degradierung von FAK beteiligter Proteasen, aufzuheben.

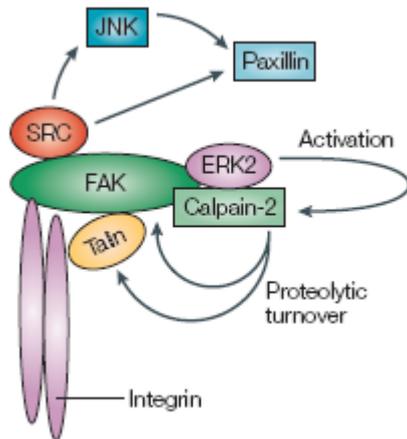
Als möglicher Mechanismus der FAK-Degradation kommt vor allem eine gerichtete Spaltung durch das in den natürlichen Abbau von FAK involvierte Calpain in Betracht<sup>87,116,117</sup>. Eine Alternative wäre eine Spaltung durch Caspase-3 im Rahmen der Apoptose<sup>118</sup>.

Zu diesem Zweck wurde ein Inhibitor von Calpain, MDL28170, eingesetzt. Calpain verdankt seinen Namen dem Umstand, dass es ein Hybrid aus dem durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen reguliertem Signalprotein Calmodulin und der Zysteinprotease Papain ist<sup>119</sup>. Calpain ist ein Bestandteil des fokalen Adhäsionskomplexes (siehe Kapitel 4.2) und leistet den katabolen Teil des Grundumsatzes von FAK<sup>120,121</sup>.

Auch im vorliegenden Fall scheint der Prozess der FAK-Degradation durch Calpain vermittelt zu sein; so konnte gezeigt werden, dass es durch den Einsatz des Calpain-Inhibitors zu einer Inhibierung der durch 4-MU ausgelösten FAK-Degradation kam (Kapitel 3.4, **Abbildung 3-14 B**).

Auf der Suche nach einem möglichen Induktor der Calpain-vermittelten FAK-Degradation gerät zunächst dessen Kalzium-vermittelte Aktivierung in den Focus. Obwohl allerdings Kalzium-Ionen *in-vitro* einen wichtigen Stimulus für die Protease-Aktivität von Calpain darstellen, wird die zur Aktivierung notwendige Konzentration (ca. 1 mM) physiologisch bei einer zytosolischen Verfügbarkeit von 1  $\mu\text{M}$  praktisch nie erreicht<sup>122</sup>.

Als aktivierender Stimulus gilt daher hauptsächlich eine Aktivierung durch ERK<sup>106,123</sup>. In diesem Zusammenhang stellt der zu beobachtende transiente Anstieg der ERK-Phosphorylierung zwischen 10 und 20 Minuten nach 4-MU-Behandlung (siehe Kapitel 3.4, **Abbildung 3-15**) eventuell das Aktivierungssignal für die Calpain-induzierte Degradation von FAK dar, die schließlich zur Dephosphorylierung von ERK nach 30 Minuten 4-MU-Behandlung führte und über 24 Stunden anhielt.



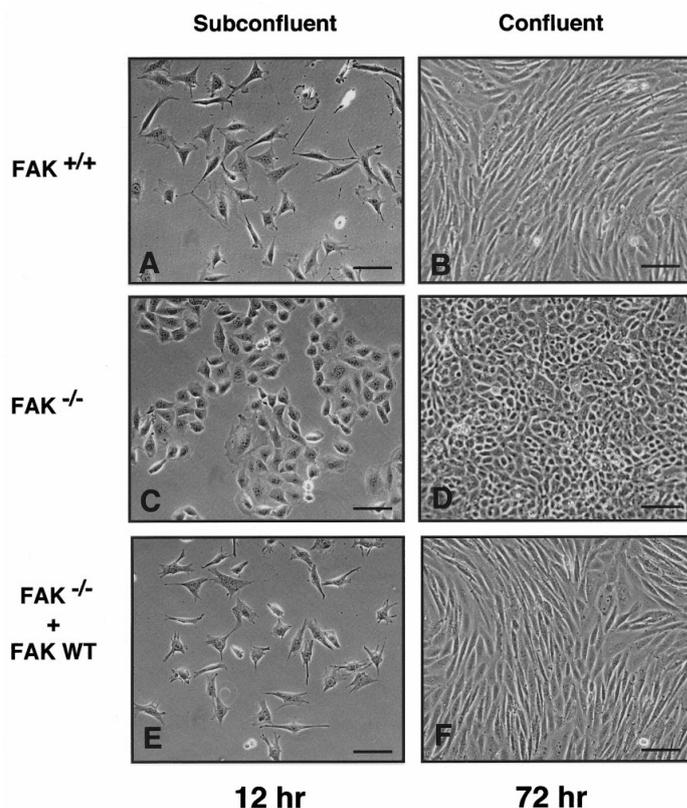
**Abbildung 4-8** Eine vermehrte Aktivierung von ERK2 führt über eine Induktion von Calpain-2 zu einer gesteigerten Degradation von FAK. Aus McLean, *The Role of FAK in Cancer*, Nat Rev Cancer (2005), Vol. 5, pp. 505-515.

Im Unterschied zu einer Caspase-vermittelten Degradation von FAK, die nur unter apoptotischen Bedingungen auftritt<sup>118,124</sup>, scheint die vorliegende Spaltung durch Calpain vermittelt zu sein, was von verschiedenen Autoren als Folge eines Verlustes an Adhäsionsstärke der fokalen Adhäsionen angesehen wird<sup>87,116,117</sup>. Diese Hypothese, die die Vorgänge im extrazellulären Bereich, nämlich in der Bindung von Integrin an das Substrat als Ursache einer FAK-Degradation sieht, untermauert die These von einer teilweise physikalischen Ursache der FAK-Degradation, wie sie unter 4.3.1 vorgeschlagen wurde.

## 4.5 Auswirkungen der FAK-Degradation auf die Zellmorphologie und MMP9

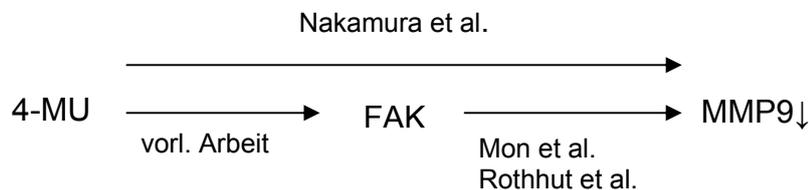
Es ist sehr wahrscheinlich, dass die unter einer Behandlung von 4-MU auftretende Degradation von FAK eine wichtige Ursache der morphologischen Veränderungen der OSC1-Zellen unter 4-MU-Einfluss darstellt. Als Folge einer FAK-Degradation ergibt sich nicht nur die Beeinträchtigung der nachgeschalteten Signalwege wie des ERK-Transduktionsweges, sondern auch die Auflösung so wichtiger Zell-Matrix-Kontakte wie den fokalen Adhäsionskomplexen. Es erscheint logisch, dass solche einschneidenden Veränderungen in der Aktivität und Proteinexpression der Adhäsionsmechanismen der Zelle eine morphologische Veränderung nach sich ziehen.

Schlaepfer *et al.*<sup>125</sup> zeigen in diesem Zusammenhang in Fibroblasten nach Ausschaltung des FAK-Gens einen Phänotyp (**Abbildung 4-9**), der ähnlich dem unter Einfluss von 4-MU in OSC1-Zellen beobachteten, eine Verflachung und *Clustering* der Zellen sowie weichere Zellränder aufweist. Ein ähnlicher Phänotyp konnte im Rahmen dieser Arbeit auch unter der Behandlung mit einem ERK-Inhibitor beobachtet werden (siehe Kapitel 3.5, **Abbildung 3-16**).



**Abbildung 4-9** Phänotyp von Fibroblasten unter Ausschaltung des FAK-Gens. (A,B) Kontrolle, (C,D) Morphologie unter FAK-Verlust, (E,F) Rekonstitution des Kontrollphänotyps unter exogener Expression von FAK. Aus Schlaepfer *et al.*, *Signaling through focal adhesion kinase*, *Progr Bio Mol Bio* (1999), Vol. 71, pp. 435-478.

Ein weiterer Baustein, der sich gut in die Ergebnisse dieser Arbeit einfügt, ist die Beobachtung von Nakamura *et al.*<sup>74</sup>, die gefunden haben, dass die Expression von MMP9 durch eine 4-MU Behandlung herunterreguliert wird. Da aktive MMPs erwiesenermaßen einen invasiven Phänotyp begünstigen können<sup>106</sup>, stellt diese Beobachtung einen günstigen Aspekt einer antiproliferativen Therapie mit 4-MU dar. Vor dem Hintergrund, dass die Expression von MMP9 in Gegenwart von FAK-Aktivität<sup>126,127</sup> zunimmt, fügt die vorliegende Arbeit durch den Nachweis der 4-MU- vermittelten FAK-Degradation die fehlende Verbindung in den Mechanismus ein (**Abbildung 4-10**).



**Abbildung 4-10** Wirkung von 4-MU auf MMP9 über FAK. Die von Nakamura *et al.* gefundene Herunterregulation von MMP9 lässt sich mit den Beobachtungen von Mon *et al.* und Rothhut *et al.*, dass FAK die MMP9-Expression reguliert und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass 4-MU zu einer FAK-Degradation führt, erklären.

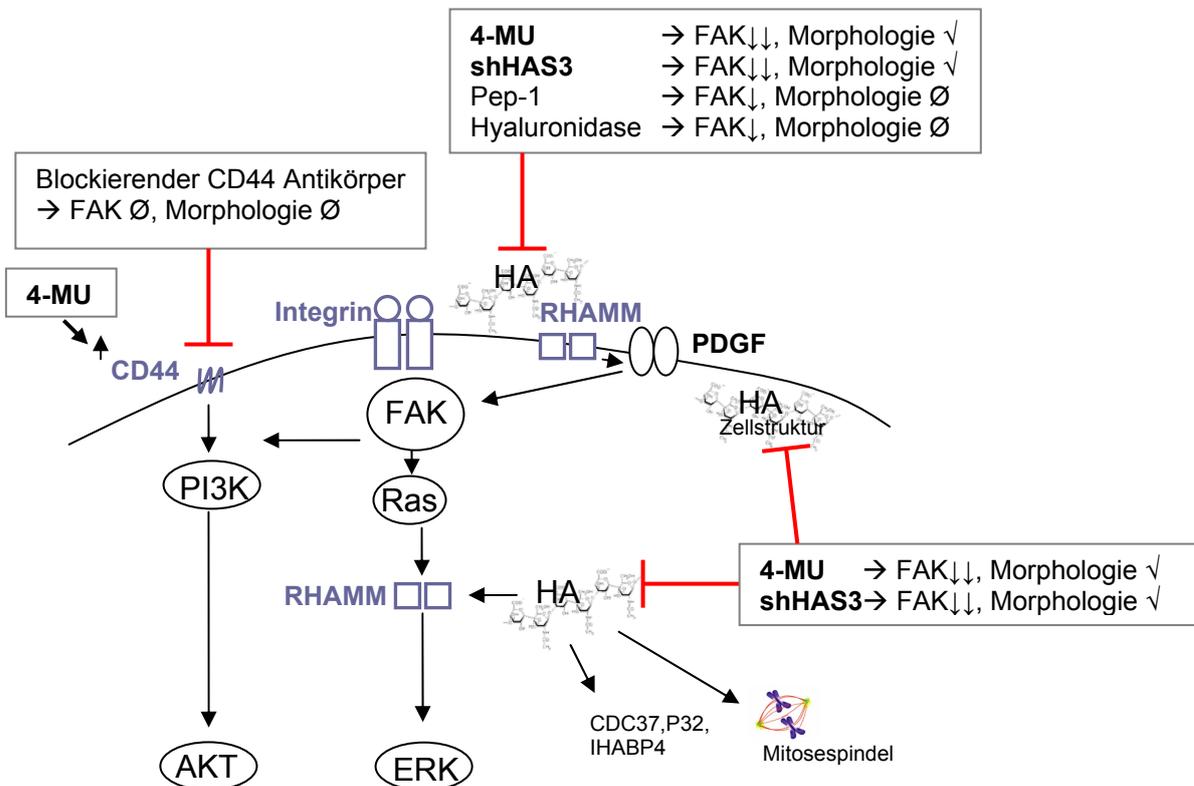
#### 4.6 FAK-unabhängige Wirkung von 4-MU auf die ERK-Aktivität

Da die Behandlung mit 4-MU eine Degradation von FAK zur Folge hat, ist eine negative Beeinflussung der nachgeschalteten Signalwege offensichtlich (siehe 4.2.2). Zusätzlich zu einer geringeren Phosphorylierung von ERK aufgrund einer verminderten FAK-Aktivität bietet der bereits unter 1.1.4 erwähnte RHAMM-Signalweg eine Verknüpfung zur Regulation der Aktivierung von ERK: Die meisten Krebszellen weisen ein stark aktives Ras System auf<sup>107,108</sup> (siehe auch 4.2.2, **Abbildung 1-2**). Hall *et al.*<sup>45</sup> und Zang *et al.*<sup>49</sup> beschreiben eine Signalkaskade, in der durch HA stimuliertes RHAMM die Aktivierung von ERK durch Ras reguliert. Eine Blockade dieses intrazellulären RHAMM-Signals durch 4-MU würde folglich zu der beobachteten anhaltenden Deaktivierung von ERK führen. Die Beteiligung dieses System würde auch erklären, warum eine durch 4-MU ausgelöste morphologische Veränderung in einer Krebszelllinie wie OSC1 entdeckt wurde, aber

keine Veränderungen in nicht transformierten Zelllinien von Fibroblasten oder glatten Gefäßmuskelzellen erfolgten: Diese Zellen weisen kein überaktives Ras-System auf. Vor dem Hintergrund dieser Theorie könnte also angenommen werden, dass der Effekt von 4-MU auf den Ras-ERK Signalweg mit Aktivierung zunimmt. Auch für den beobachteten Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts unter 4-MU-Behandlung (Kapitel 3.3, **Abbildung 3-12**) würde unter einer Beteiligung von RHAMM eine weitere Erklärungsmöglichkeit existieren, da RHAMM direkte Interaktionen mit Aktinfilamenten eingeht<sup>128</sup>.

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von ERK an dem von 4-MU ausgelösten Phänotyp ist die Beobachtung, dass der selektive ERK1- und ERK2-Inhibitor U0126-Ethanolat einen Phänotyp hervorrief, der dem unter 4-MU-Behandlung vergleichbar war (Kapitel 3.4, **Abbildung 3-16**). Ein überschießender ERK-Signalweg stellt einen wichtigen, in einer Vielzahl von Tumorarten nachweisbaren, Malignitätsfaktor dar und ist deshalb die therapeutische Zielstruktur vieler in der Entwicklung befindlicher Chemotherapeutika<sup>129</sup>. In Bezug darauf könnte die Herunterregulation von ERK und AKT als ein viel versprechender Wirkmechanismus angesehen werden, der für eine pharmakologische Therapie wertvoll wäre.

#### 4.7 Die verschiedenen Hemmstoffe der Hyaluronsäure-Wirkungen und ihre Effekte auf FAK-Degradation und Zellmorphologie - Zusammenfassung



**Abbildung 4-11** Zusammenfassung der in die Hyaluronsäure-Wirkung eingreifenden Substanzen (graue Kästen). Unterschieden wird zwischen den nur extrazellulär und den extra- und intrazellulär wirkenden Substanzen (in fett). Dargestellt sind die möglichen Zielstrukturen sowie relevante Signaltransduktionswege.

Um die Einflüsse der verschiedenen in die Hyaluronsäure-Wirkung eingreifenden Substanzen und ihre unterschiedliche Auswirkung auf FAK-Degradation und die morphologischen Veränderungen zu verstehen, muss man die Angriffspunkte der einzelnen Stoffe näher betrachten und in einen vergleichenden Kontext setzen.

Das Übersichtsschema zeigt die Angriffspunkte der Hyaluronsäure (HA) und wichtige, in dieser Arbeit untersuchte Signaltransduktionswege im Überblick.

Zu unterscheiden sind dabei extrazelluläre Zielstrukturen, wie die beiden Hyaluronsäurerezeptoren RHAMM und CD44 und die im Extrazellulärraum

angesiedelte, indirekte, physikalische Wirkung der Hyaluronsäure auf die Stabilität der Integrine, die in Kapitel 4.3.1 diskutiert wird. Dem gegenüber stehen die weniger gut untersuchten intrazellulären Wirkungen der Hyaluronsäure. Evanko *et al.* beschreiben eine Akkumulation intrazellulärer Hyaluronsäure in mitotischen Zellen mit einer starken Anhäufung im Bereich der Mitosespindel und den Zentromeren<sup>130</sup>. Intrazelluläre Hyaluronsäure bindet an RHAMM<sup>11,128</sup> und aktiviert damit unter anderem den Ras-ERK-Signalweg<sup>49</sup> (siehe auch 1.1.4). Weitere Veröffentlichungen fanden eine wachsende Anzahl von intrazellulären Bindeproteinen für Hyaluronsäure wie CDC37<sup>131</sup>, ein Zellzyklusregulator, P32<sup>132</sup>, ein Kofaktor beim Spleißen der pre-mRNA durch SF2 (*Splicing factor 2*) und IHABP4<sup>133</sup>, dessen Funktion bisher nicht bekannt ist. Außerdem ist vorstellbar, wenn auch bisher nicht genauer untersucht, dass Hyaluronsäure durch seine quellenden Eigenschaften einen Einfluss auf die Zellform ausüben könnte.

Die eingesetzten Hemmstoffe der Hyaluronsäure-Wirkungen und ihr Einfluss auf die FAK-Degradation und die Zellmorphologie sind in grauen Kästen dargestellt. Dabei sind die sowohl extra- als auch intrazellulär angreifenden Prinzipien 4-MU und Interferenz-RNA gegen HAS3 (shHAS3) fett gedruckt. Auffällig ist, dass nur diese einen Einfluss auf den makroskopisch erkennbaren morphologischen Phänotyp der OSC1-Zellen aufwiesen und zusätzlich eine stärkere FAK-Degradation als die nur extrazellulär aktiven Substanzen aufwiesen. Die zusätzliche intrazelluläre Wirkung dieser beiden Moleküle scheint folglich für eine gesteigerte FAK-Degradation und die Formveränderung der Zelle ausschlaggebend zu sein. Angriffspunkte in der Zelle sind die erwähnte Beeinträchtigung der Funktion von intrazellulärem RHAMM, anderen HA-Bindeproteinen, der Mitosespindel und eventuell der physikalischen Stützwirkung der HA.

Die stärkere Wirkung der amphitrop wirkenden Substanzen beruht somit wahrscheinlich auf der Ausnutzung beider beschriebener Mechanismen: sowohl des unter 4.3.1 diskutierten extrazellulärem hyaluronsäure-integrin-vermittelten Weges als auch der in 4.3.2 erläuterten Beteiligung von intrazellulärem RHAMM.

Den extrazellulär wirkenden Substanzen stehen nur der Hyaluronsäure-Integrin Weg und die Signaltransduktion über die Hyaluronsäurerezeptoren zur Verfügung. Wie

aus **Abbildung 4-11** hervorgeht, führt eine Blockade des extrazellulären RHAMM-Rezeptors zu einer verminderten PDGF-Rezeptor-vermittelten Aktivierung von FAK. Eine Blockade des CD44-Rezeptors mit einem blockierenden Antikörper zeigte hingegen keinen Einfluss auf FAK-Degradation oder Morphologie. Diese Beobachtung könnte sowohl durch den signal-überschreibenden Einfluss von FAK auf die PI3K als auch eventuell durch die in Kapitel 3.3 in **Abbildung 3-9** gezeigte, wahrscheinlich reflektorische, Aufregulierung und damit Signalverstärkung des CD44-Rezeptors erklärt werden.

Wie unter 4.5 erläutert, ist die Degradation von FAK eine mögliche Erklärung für die morphologischen Veränderungen der Zellen. Die schwächere Wirkung der nur extrazellulär angreifenden Substanzen auf die FAK-Degradierung scheint nicht für einen morphologischen Effekt auszureichen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit der besseren Wirkung der auch intrazellulär angreifenden Substanzen wäre eine nur über intrazelluläres RHAMM stattfindende Wirkung oder die erwähnte Möglichkeit einer direkten physikalischen Beeinflussung der intrazellulären Hyaluronsäurestruktur.

## 4.8 Auf Aktin basierende Strukturen

Die Aktin-Fasern des Zytoskeletts spielen für die Bildung und Aufrechterhaltung einer Vielzahl von Strukturen eine wichtige Rolle, die vor allem für die Zellbewegung von Bedeutung sind. Relevante mikroskopisch erkennbare Strukturen umfassen Filopodien, Mikrovilli und Lamellipodien<sup>53</sup>. Podosomen und Invadopodia sind ausschließlich ventral vorkommende Strukturen und sollen hier nicht näher besprochen werden. Alle genannten Zellstrukturen stellen Membranausstülpungen verschiedener Größe dar, die einen Aktin-Strang beinhalten. Zu unterscheiden sind die „blatt-artigen“ Strukturen wie Lamellipodien und die „finger-artigen“ Strukturen wie Mikrovilli und Filopodien.

**Lamellipodien** sind durch flächige Ansammlungen von fokalen Adhäsionskomplexen und einer starken Verdichtung des Zytoskeletts gekennzeichnet. Lamellipodien bilden während des Vorganges der Migration die Führungslamelle der Zellbewegung. Im Gegensatz dazu haben Filopodien und Mikrovilli eher eine sondierende Funktion und bestimmen im Vorfeld der Migration die Wanderungsrichtung.

Die Zellmigration lässt sich als eine Art von Kriechbewegung beschreiben, die ein konzertiertes Zusammenspiel krafterzeugender Zytoskelett-Komponenten und kraftübertragender Adhäsionsstrukturen voraussetzt<sup>134,135</sup>.

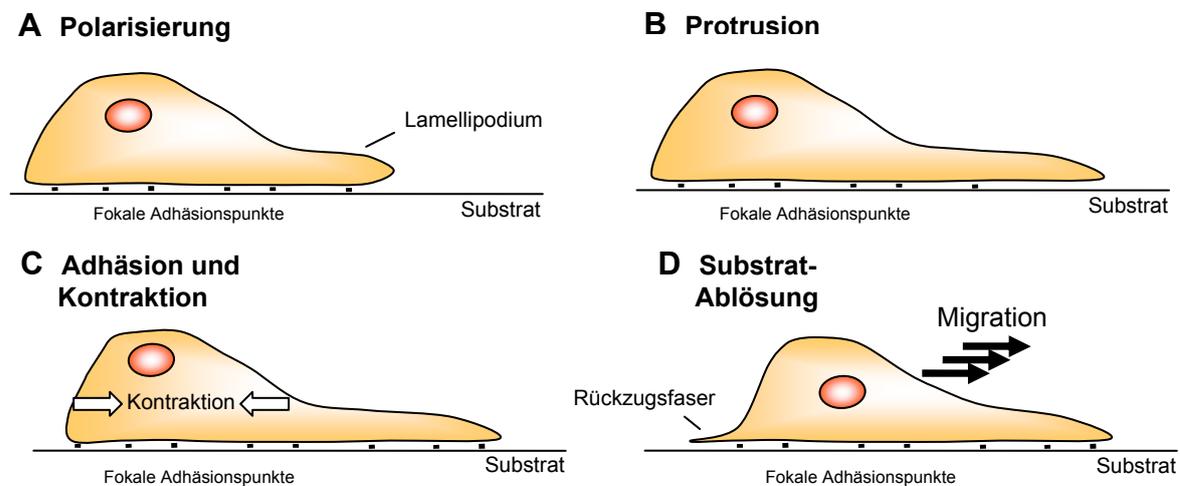
Nachdem durch Abtasten der Umgebung mit den Filopodien und Mikrovilli eine Entscheidung für die Bewegungsrichtung gefallen ist, beginnt der eigentliche Vorgang der Migration. Man kann diesen Prozess in verschiedene Stufen gliedern, welche in **Abbildung 4-12** schematisch dargestellt sind<sup>134,135</sup>.

**A. Polarisierung.** Eine Voraussetzung für die Migration ist die Polarisierung der Zelle mit klar unterscheidbarer Vorder- und Hinterseite. Die Vorderseite wird vom blattartigen Lamellipodium eingenommen, das auch die Bewegungsrichtung der Zelle festlegt. Die Filopodien ragen als kleine fingerförmige Ausstülpungen aus dem Lamellipodium heraus und unterliegen einem dynamischen Auf- und Abbau.

**B. Protrusion.** Durch Aktinpolymerisation am vorderen Rand der Zelle (Führungslamelle, *Leading Edge*) wird die Zellmembran nach vorne geschoben, was eine Verlängerung von Lamellipodien und Filopodien zur Folge hat. Dieser Vorgang wird als Protrusion bezeichnet.

**C. Adhäsion und Kontraktion.** Neue fokale Adhäsionskomplexe werden gebildet und verankern die vorgeschobene Führungslamelle im Substrat. Durch myosin-vermittelte Kontraktion über die Aktinfasern zieht sich die Zelle zusammen. Die Zugkräfte werden dabei auf die Adhäsionsstellen übertragen.

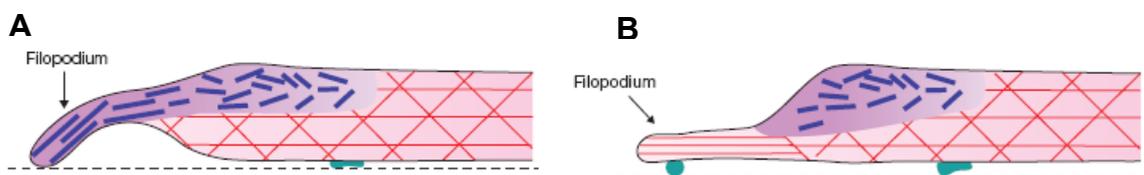
**D. Substrat-Ablösung.** Durch eine calpain-vermittelte Degradierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) wird die Auflösung der rückwärtig liegenden fokalen Adhäsionskomplexe betrieben.



**Abbildung 4-12** Stadien der Migration. Nach einer Polarisierung (A) findet eine Lamellipodienprotrusion in Wanderungsrichtung statt (B), die von einer Adhäsion über fokale Adhäsion und einer Kontraktion der Aktinfasern gefolgt wird (C). Den Abschluss bildet die Ablösung von den nicht mehr benötigten Bindungsstellen (D).

**Filopodien** werden meist aus Lamellipodien heraus entwickelt. Chhabra und Higgs<sup>53</sup> beschreiben zwei Mechanismen der Filopodien-Entwicklung, wie in **Abbildung 4-13** dargestellt.

Entweder werden die Filopodien aus den Aktinfasern der Lamellipodie durch einen sogenannten Konvergenz-Elongations-Mechanismus gebildet (A). In diesem Fall existiert keine fokale Adhäsionskinase in der Filopodienspitze. Die zweite Art geht aus dem lamellären Netzwerk hervor und enthält einen fokalen Adhäsionskomplex in der Spitze (B). Die Bildung dieser Art von Filopodien ist noch nicht gänzlich verstanden.



**Abbildung 4-13** Die zwei Arten von Filopodien. (A) Ein aus den Aktinfasern des Lamellipodiums entstehendes Filopodium enthält an seiner Spitze keinen fokalen Adhäsionskomplex. (B) Ein aus dem lamellären Netzwerk heraus aufgebautes Filopodium bildet an seiner Spitze einen fokalen Adhäsionskomplex. Aus Chhabra und Higgs, *The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures*. Nat Cell Biol. 2007;9:1110-21.

Filopodien und Mikrovilli sind als maximal 200 Nanometer (nm) breite Zellfortsätze definiert, die parallele Bündel von 10-30 Aktinfilamenten enthalten<sup>53</sup>. Chhabra und Higgs<sup>53</sup> legen weiter als wichtigstes Unterscheidungskriterium zwischen Mikrovilli und Filopodien die Tatsache fest, dass Filopodien substrat-basiert wachsen, Mikrovilli nicht. In diesem Zusammenhang beschreiben sie auch die Existenz von Mischformen zwischen Filopodien und Mikrovilli. Filopodien werden regelmäßig in einer Vielfalt an Zellarten gefunden, so etwa Fibroblasten und Nervenzellen<sup>136</sup>. Sie werden allgemein als direktionale Sensoren eingestuft<sup>137</sup>, die ihrer Aufgabe eventuell durch eine Anreicherung aktivierter Integrine in der Spitze nachkommen<sup>138</sup>.

**Mikrovilli** kommen physiologisch auf der luminalen Seite von intestinalen oder Nierenepithelzellen vor, sind dort aber eng gepackt und von gleicher Länge<sup>139</sup>. Mikrovilli variabler Länge sind auf der Oberfläche vieler Zellen präsent, so z.B. auf zirkulierenden Lymphozyten und auf der dorsalen Seite vieler in Kultur gehaltener Zellen<sup>140,141</sup>. Diese Mikrovilli haben meist andere Funktionen, als die der Oberflächenvergrößerung dienenden luminalen Mikrovilli; so scheiden sie als Bestandteile der Zellmembran von Lymphozyten Zelloberflächenproteine ab, die für die Extravasation wichtig sind<sup>142,143</sup>.

## 4.9 Struktur und mögliche Funktion der beobachteten Zellfortsätze

### 4.9.1 Struktur

Auf der Basis der in Kapitel 4.8 genannten aktin-haltigen Strukturen, soll eine Klassifizierung der beobachteten Zellfortsätze erfolgen: Es stellt sich die Frage nach der Zuordnung zu Filopodien oder Mikrovilli. Nach der Definition von Chhabra und Higgs<sup>53</sup> wachsen Filopodien substrat-adhären und können fokale Adhäsionskomplexe ausbilden. Mikrovilli sind auf der dorsalen Seite von kultivierten Zellen zu finden und weisen keine Substrathaftung auf. Beide Strukturen bestehen aus parallelen Aktin-Bündeln und sind höchstens 200 nm breit. Vor diesem Hintergrund ist die Mehrzahl der beobachteten Zellfortsätze als Filopodien zu bezeichnen. Nur die dreidimensionale konfokale Aufnahme in **Abbildung 3-21** weist dorsal wachsende Mikrovilli auf. Offen bleibt, ob beide Strukturen ineinander übergehen können oder getrennt nebeneinander existieren. Die Beobachtung von Svitkina *et al.*<sup>144</sup>, dass ein kontinuierlicher Umbau zwischen Mikrovilli, Filopodien und Rückzugsfasern stattfindet, macht die zweite Möglichkeit wahrscheinlich. Es konnte nachgewiesen werden, dass in OSC1-Zellen aktive fokale Adhäsionskomplexe heterogen verteilt, d.h. sowohl in der Spitze als auch an der Wurzel der Zellfortsätze vorlagen (Kapitel 3.8, **Abbildung 3-26**). Diese Tatsache zeigt, dass die beobachteten Strukturen möglicherweise beiden in Kapitel 4.8, **Abbildung 4-13** beschriebenen Klassen von

Filopodien zuzuordnen sind. Um auszuschliessen, dass es sich bei den beobachteten Zellfortsätzen nur um Rückzugsfasern handelt, wurden zum Beweis der Progressivität der beschriebenen Strukturen die Zellen einem Adhäsions- und Wachstumsversuch unterworfen. 10 bis 20 Minuten nach Zellaussaat konnten bereits erste Filopodien detektiert werden (Kapitel 3.8, **Abbildung 3-27** und **Abbildung 3-28**). Die immunozytochemische Anfärbung mit einem phospho-Tyrosin-Antikörper (pTyr 100), der in diesem Wachstumsstadium hochselektiv für phosphorylierte fokale Adhäsionen ist, detektierte aktive fokale Adhäsionskomplexe in den gebildeten Zellfortsätzen. Dies zeigt eindeutig die protrusive Ausrichtung dieser Strukturen und unterscheidet sie somit von Rückzugsfasern, die in diesem Stadium der Anheftung nicht vorkommen.

Die beschriebenen Zellfortsätze glichen bis auf die Substrathftung den Mikrovilli, die von Kultti *et al.* in Verbindung mit einer HAS-Überexpression beschrieben wurden<sup>145</sup>, insofern, dass jene ebenfalls eine perizelluläre HA-Matrix aufwiesen und wahrscheinlich durch eine starke HA-Produktion entstanden. Im Gegensatz zu diesen hatten die hier charakterisierten Strukturen allerdings keine Verdickung an der Spitze und wiesen mitunter Verzweigungen auf. Hinzu kommt, dass die Fortsätze zwar dreidimensional über die ganze Zelle verteilt vorlagen, aber dennoch eine stärkere Ausprägung im Bereich der Zellkulturplatte aufwiesen, was für ein substrataffines Wachstumsverhalten spricht (siehe oben). Diese Tatsache, zusammen mit dem Nachweis des HA-Rezeptors CD44 und dem phosphorylierten, aktiven FAK in den Filopodien, impliziert eine spezifische Funktion dieser Strukturen im Kontext der substratabhängigen Progression und eines Ab tastens der extrazellulären Matrix.

Das Vorkommen mikrovilli-ähnlicher Strukturen in verschiedenen Krebszellarten wurde auch von anderen Autoren berichtet. Oury *et al.*<sup>146,147</sup> beschreiben nicht-verzweigte Mikrovilli, die stark von HA umhüllt waren. Zu *et al.*<sup>148</sup> diskutieren einen möglichen Zusammenhang solcher mikrovilli-artigen Strukturen mit einem invasiven Geschehen.

#### 4.9.2 Mögliche Funktion der Filopodien

In einer Mischkultur zwischen OSC1-Zellen und Fibroblasten, einem Modell für die Tumor-Stroma-Interaktionen, zeigte sich, dass die Zellfortsätze an invasiven Prozessen beteiligt sein könnten (**Abbildung 3-32**). So fehlte die für nicht transformierte Zellen typische Kontaktinhibition des Zellwachstums, wodurch OSC1-Zellen unter Beteiligung der Filopodien unter Fibroblasten hindurchwanderten. Zusätzlich waren sondierende Strukturen zu erkennen, die den extrazellulären Raum zwischen OSC1-Zellen und Fibroblasten fast vollständig ausfüllten. Die Beobachtung, dass OSC1-Zellen in Nachbarschaft zu Fibroblasten verstärkt Filopodien aufwiesen, lässt auf eine eventuell über extrazelluläre Botenstoffe vermittelte Aktivierung der Krebszellen durch die Stromazellen schließen. Zusätzlich zu den bekannten mitogenen Faktoren wie z.B. dem *Migration stimulierenden Faktor* (MSF)<sup>149</sup> könnten in diesem Zusammenhang die in den Veröffentlichungen von Formby *et al.*<sup>56</sup>, Rudrabhatla *et al.*<sup>57</sup> und Stern *et al.*<sup>55</sup> beschriebenen Mechanismen eine Rolle spielen. Sie wiesen nach, dass eine vermehrte Ausschüttung von Laktat, wie sie durch den Warburg-Effekt, der aeroben Glykolyse, zustande kommt und charakteristisch für viele Krebszellen ist, die Hyaluronsäureproduktion der Stromazellen stark steigert. Die vermehrt gebildete Hyaluronsäure wiederum übt eine stark stoffwechsel-aktivierende und proliferative Wirkung auf die Krebszellen aus.

Die erhobenen Daten legen nahe, dass die hier beschriebenen Filopodien progressive und invasive Strukturen darstellen, denen eine Bedeutung in Vorgängen der Adhäsion und Zellausbreitung zukommen könnte. Aus dem hohen Gehalt an CD44 und dem in der Mischkultur zu beobachtenden Verhalten lässt sich außerdem eine Funktion der Filopodien als Sensoren der Zelle ableiten, mit deren Hilfe die umgebende Matrix abgetastet wird, um so z.B. Bereiche mit einem höheren Hyaluronsäuregehalt zu detektieren, die der Krebszelle eine leichtere Invasion ermöglichen.

#### 4.10 Mechanismen der 4-MU induzierten Rückbildung der Zellfortsätze

Es konnte nachgewiesen werden, dass die untersuchten Filopodien über fokale Adhäsionskomplexe in der Extrazellulärmatrix verankert vorliegen (3.8, **Abbildung 3-26**). Die fokalen Adhäsionskomplexe liegen dabei je nach Art des Filopodiums entweder distal oder proximal zur Zellmembran und bilden eine enge Verbindung zu den Aktinfasern, die für eine Aufrechterhaltung der Struktur der Filopodien sorgen (3.8, **Abbildung 3-25**).

Eine wahrscheinliche Erklärung für die Auflösung der Filopodien unter Behandlung mit 4-MU stellt daher die bereits im ersten Teil der Diskussion besprochene 4-MU induzierte FAK-Degradation dar, da diese zu einem Verlust an fokalen Adhäsionskomplexen führt, wodurch die Protrusionen ihrer Verankerung in der Extrazellulärmatrix beraubt werden. Hinzu kommt die in der Folge einer Degradation von FAK auftretende Auflösung des Aktin-Zytoskeletts. Dieses ist, wie der Einsatz des Aktin-Polymerisierungs-Inhibitors Lantrunculin A zeigte (**Abbildung 3-25**), zur Aufrechterhaltung der Strukturintegrität der Filopodien nötig.

Eine weitere Erklärung für die Verminderung der Zellfortsätze in Gegenwart von 4-MU wird von Kultti *et al.*<sup>145</sup> beschrieben. Diese stellten die Theorie auf, dass Hyaluronsäure bei starker in Membrannähe ablaufender Synthese über physikalische Kräfte auf die Zellmembran einwirkt und so eine Mikrovillus-Bildung auslöst. Eine Behandlung mit 4-MU würde dieser Theorie nach über eine Aufhebung der Struktur des perizellulären Hyaluronsäure-Mantels zum Zusammenbruch der Integrität der Protrusionen führen.

## 4.11 Ausblick

Die Elimination der Zellfortsätze durch 4-MU legt nahe, dass 4-MU einen viel versprechenden Arzneistoff zur Verhinderung der Tumorzellausbreitung darstellen könnte. Das Vorkommen der hier beschriebenen 4-MU-empfindlichen Strukturen in anderen Tumorzelllinien als den untersuchten OSC1-Zellen (Kapitel 3.11, **Abbildung 3-33**) zeigt die Tumorzellarten übergreifende Relevanz dieses Angriffpunktes. Auch die beobachtete Auflösung der fokalen Adhäsionskomplexe, die zu einer Einschränkung der Motilität der OSC1-Zellen führte und die Degradation von FAK, die eine Deaktivierung der nachgeschalteten für Proliferation, Migration und Überleben wichtigen Signalwege nach sich zieht, sind wichtige tumorsuppressive Effekte. Durch die unternommenen Proliferations- und Migrationsexperimente, in denen 4-MU einen eindeutigen hemmenden Effekt auf die Krebszellen aufwies, ist der Beweis erbracht, dass die beobachteten Veränderungen im Phänotyp der Zellen funktionelle Relevanz aufweisen. Somit wäre eine weitere Erforschung dieser Substanz *in vivo* sinnvoll. Interessant für diese Fragestellung wäre ein immundefizientes Nacktmausmodell, in dem die Auswirkungen von oral verabreichten 4-MU auf das Anwachsen und die Metastasierung von subkutan oder intravenös applizierten OSC1-Zellen untersucht werden könnten. In zweiter Instanz wäre eine Evaluierung der Wirksamkeit von 4-MU als Tumorthapeutikum in klinischen Studien wünschenswert.

#### **4.12 Fazit**

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal die Wirkung einer pharmakologisch induzierten Verarmung an Hyaluronsäurematrix auf den Phänotyp und die funktionellen Eigenschaften von Ösophaguskarzinomzellen und untersucht die diesem Phänomen zugrunde liegenden Signalwege.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die Hyaluronsäurematrix eine wichtige Rolle in der Unterhaltung und Förderung von Motilität und Proliferation von Tumorzellen spielt. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Ösophagus-Karzinomzellen eine Vielzahl an Filopodien ausbildeten, die mit Hyaluronsäure assoziiert waren. Eine Entfernung der Hyaluronsäure zog eine Rückbildung dieser Strukturen nach sich. Zusätzlich führte die Hyaluronsäuredepletion zu einer Auflösung von fokalen Adhäsionen, einer proteolytischen Spaltung von FAK, einem Abbau des Zytoskeletts und einem eingeschränkten ERK und AKT Signalweg. In Folge dessen verloren die Krebszellen ihre Motilität und veränderten ihre Morphologie. Diese Beobachtungen zeigten eindrucksvoll die Bedeutung des Hyaluronsäuresystems für diese Tumorzellen.

## 5 Zusammenfassung

Eine überschießende Produktion an Hyaluronsäure in der Umgebung von gastrointestinalen Tumorzellen ist ein wichtiges Merkmal dieser Erkrankung. Hyaluronsäure ist für eine Vielzahl an malignen Eigenschaften von Krebszellen verantwortlich wie ein erhöhtes invasives Potential, Proliferation, Neigung zur Metastasierung und einer Anheftung an nicht transformiertes Stromagewebe. Das Ösophaguskarzinom ist ein seltener aber schwerwiegender Tumor des Gastrointestinaltraktes und wird in Plattenepithel- und Adenokarzinom unterteilt. 4-Methylumbelliferon (4-MU) ist ein Inhibitor der Hyaluronsäuresynthasen (HAS1-3). Um die spezifischen Effekte von 4-MU auf die Hyaluronsäurematrix von Krebszellen und die diesen zugrunde liegenden Signalwege zu untersuchen, wurde eine Ösophagus-Krebszelllinie mit einem distinkten HAS-Expressionsmuster ausgewählt (HAS3>HAS2>>>HAS1). OSC1-Zellen zeigten eine starke Anhäufung an Zellfortsätzen auf der Zelloberfläche, die mit perizellulärer Hyaluronsäurematrix umhüllt waren. 4-MU führte zu einer Auflösung dieser Strukturen und darüber hinaus zu einem eindrucksvollen morphologischen Phänotyp, der eine Abflachung und eine Zusammenballung der Krebszellen einschloss. Als mögliche Ursache konnten eine Dephosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und eine Calpain-induzierte FAK-Degradation festgestellt werden. Diese Vorgänge führten zu einem Zusammenbruch des Zellgerüsts und zu einer Auflösung der fokalen Adhäsionskomplexe. Außerdem resultierte die Behandlung mit 4-MU in einer erniedrigten Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT, die nachgeschaltete Signaltransduktionswege der FAK kontrollieren. Die Effekte von 4-MU waren nicht CD44-abhängig, wie mit einem blockierenden Antikörper gegen CD44 gezeigt werden konnte. Eine lentivirale Ausschaltung der Genexpression von HAS3 mit Interferenz-RNA verursachte hingegen alle Auswirkungen einer 4-MU-Behandlung. Damit ist belegt, dass die beobachteten Effekte unter 4-MU hyaluronsäureabhängig waren. Die genannten Mechanismen führen schließlich zu einer Hemmung von Proliferation und Migration der Krebszellen. Darüber hinaus wurde unter Behandlung mit 4-MU das aggressive Wachstum der OSC1-Zellen in Ko-Kultur-Versuchen mit Stromazellen eingeschränkt. 4-MU könnte daher therapeutisches Potential in der Behandlung von Tumorerkrankungen aufweisen. Daher erscheint es interessant, in zukünftigen Tierversuchen und gegebenenfalls klinischen Untersuchungen 4-MU weiter für eine Indikation in der Onkologie zu untersuchen.

## 6 Summary

Abundant production of hyaluronic acid (HA) in the vicinity of gastrointestinal cancer cells is a hallmark of tumor development. Hyaluronan accounts for a plethora of malignant properties of cancerous phenotype such as invasive potential, proliferation, metastatic spread and adhesion to stroma tissue. Esophageal cancer is a rare but severe kind of gastrointestinal cancer which is differentiated in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus. 4-methylumbelliferone (4-MU) is an inhibitor of the hyaluronan synthases (HAS1-3) and is thought to have promising properties as an anticancer agent. We used a squamous cancer cell line (OSC1) expressing HAS3>HAS2>>>HAS1 to evaluate the specific effects of 4-MU on the phenotype of OSC1 and the underlying pathways.

OSC1 exhibit a unique and strong expression of microvillus-like structures, which are associated with the hyaluronan matrix. These structures were shown to be involved in cancer cell invasion. 4-MU induced resolution of these structures and caused a distinct morphological change in OSC1 which was at least partly based on a calpain-mediated cleavage of focal adhesion kinase (FAK). These actions subsequently led to a resolution of focal adhesions and a collapse of the cytoskeleton. Moreover, treatment with 4-MU resulted in a decreased phosphorylation of ERK1/2 and AKT, two downstream targets of FAK. The effects of 4-MU were not CD44 dependent as shown by use of a CD44-blocking antibody. A lentiviral delivered knockdown of HAS3 expression mimicked all effects of 4-MU treatment, showing that the observed effects were dependent on hyaluronan depletion. As a consequence, 4-MU inhibited proliferation and migration of the cancer cells. In addition, 4-MU diminished invasive growth of the cancer cells under co-culture conditions. We conclude that 4-MU leads to a breakdown of the cancer matrix interactions and therefore might be useful in the control of esophageal cancer.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Kodierende DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cpm	Radioaktive Ereignisse pro Minute
Cy3	Carboncyanin 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, DNS	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
ELISA	Enzymkonjugierter immunvermittelter Assay
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunden
HA	Hyaluronsäure
HAbP	Hyaluronsäurebindeprotein
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus 1
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
INN	<i>International nonproprietary name</i> , Internationaler markenfreier Name
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> , Lange endständige Wiederholung
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MG	Molekulargewicht

Min.	Minuten
MMP	Matrix Metalloproteinase
MOI	Multiplicity of Infektion, Verhältnis zwischen Viren und Zielzellen
mRNA	<i>Messenger-RNA</i> , Boten-RNS
MSF	Migration stimulierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Aus Plättchen stammender Wachstumsfaktor, <i>Platelet derived growth factor</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA, RNS	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i> , kleine Haarnadel RNS
siRNA	<i>Small interference RNA</i> , kleine Interferenz RNS
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis Virus G-Protein

## 8 Literaturverzeichnis

1. Fischer JW. Angiotensin II and vascular endothelial matrix. In: T U, Schölkens B, eds. *Angiotensin Vol. II*. New York: Springer Verlag; 2004:54.
2. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*. 2006;85:699-715.
3. Itano N, Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*. 2002;54:195-9.
4. Schulz T, Schumacher U, Prehm P. Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP. *J Biol Chem*. 2007;282:20999-1004.
5. Meyer K, Palmer J. The polysaccharide of the vitreous humour. *J Biol Chem*. 1934;107:629-624.
6. Fam H, Bryant JT, Kontopoulou M. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology*. 2007;44:59-74.
7. Toole BP. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology*. 2002;12:37R-42R.
8. Toole BP, Hascall VC. Hyaluronan and tumor growth. *Am J Pathol*. 2002;161:745-7.
9. Day AJ, Prestwich GD. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem*. 2002;277:4585-8.
10. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*. 2002;277:4589-92.
11. Entwistle J, Hall CL, Turley EA. HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton. *J Cell Biochem*. 1996;61:569-77.
12. Xu H, Ito T, Tawada A, Maeda H, Yamanokuchi H, Isahara K, Yoshida K, Uchiyama Y, Asari A. Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J Biol Chem*. 2002;277:17308-14.
13. Termeer CC, Hennies J, Voith U, Ahrens T, Weiss JM, Prehm P, Simon JC. Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol*. 2000;165:1863-70.
14. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 2002;195:99-111.
15. Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem*. 2004;279:17079-84.
16. Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M. Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem*. 2003;278:32259-65.
17. Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, Savani RC, Kumar S. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol*. 2007;26:58-68.
18. West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*. 1985;228:1324-6.

19. Sattar A, Rooney P, Kumar S, Pye D, West DC, Scott I, Ledger P. Application of angiogenic oligosaccharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin. *J Invest Dermatol.* 1994;103:576-9.
20. Slevin M, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J Biol Chem.* 2002;277:41046-59.
21. Feinberg RN, Beebe DC. Hyaluronate in vasculogenesis. *Science.* 1983;220:1177-9.
22. McBride WH, Bard JB. Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J Exp Med.* 1979;149:507-15.
23. Delmage JM, Powars DR, Jaynes PK, Allerton SE. The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid. *Ann Clin Lab Sci.* 1986;16:303-10.
24. Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J.* 1993;7:1233-41.
25. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol.* 2004;83:317-25.
26. Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* 2001;20:499-508.
27. Udabage L, Brownlee GR, Nilsson SK, Brown TJ. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res.* 2005;310:205-17.
28. Udabage L, Brownlee GR, Waltham M, Blick T, Walker EC, Heldin P, Nilsson SK, Thompson EW, Brown TJ. Antisense-mediated suppression of hyaluronan synthase 2 inhibits the tumorigenesis and progression of breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65:6139-50.
29. Underhill CB, Green SJ, Comoglio PM, Tarone G. The hyaluronate receptor is identical to a glycoprotein of Mr 85,000 (gp85) as shown by a monoclonal antibody that interferes with binding activity. *J Biol Chem.* 1987;262:13142-6.
30. Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem.* 2000;275:26967-75.
31. Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today.* 1989;10:423-8.
32. Haynes BF, Liao HX, Patton KL. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells.* 1991;3:347-50.
33. Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.* 2002;277:38013-20.
34. Ward JA, Huang L, Guo H, Ghatak S, Toole BP. Perturbation of hyaluronan interactions inhibits malignant properties of glioma cells. *Am J Pathol.* 2003;162:1403-9.
35. Herrlich P, Zoller M, Pals ST, Ponta H. CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today.* 1993;14:395-9.
36. Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *Embo J.* 1991;10:343-8.

37. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*. 1991;65:13-24.
38. Sy MS, Guo YJ, Stamenkovic I. Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J Exp Med*. 1991;174:859-66.
39. Jalkanen S, Jalkanen M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol*. 1992;116:817-25.
40. Fujita Y, Kitagawa M, Nakamura S, Azuma K, Ishii G, Higashi M, Kishi H, Hiwasa T, Koda K, Nakajima N, Harigaya K. CD44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect. *FEBS Lett*. 2002;528:101-8.
41. Entwistle J, Zhang S, Yang B, Wong C, Li Q, Hall CL, A J, Mowat M, Greenberg AH, Turley EA. Characterization of the murine gene encoding the hyaluronan receptor RHAMM. *Gene*. 1995;163:233-8.
42. Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM, Turley EA. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol*. 1992;117:1343-50.
43. Hall CL, Wang C, Lange LA, Turley EA. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J Cell Biol*. 1994;126:575-88.
44. Hall CL, Turley EA. Hyaluronan: RHAMM mediated cell locomotion and signaling in tumorigenesis. *J Neurooncol*. 1995;26:221-9.
45. Hall CL, Yang B, Yang X, Zhang S, Turley M, Samuel S, Lange LA, Wang C, Curpen GD, Savani RC, Greenberg AH, Turley EA. Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell*. 1995;82:19-26.
46. Turley EA. Molecular mechanisms of cell motility. *Cancer Metastasis Rev*. 1992;11:1-3.
47. Turley EA. Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev*. 1992;11:21-30.
48. Samuel SK, Hurta RA, Spearman MA, Wright JA, Turley EA, Greenberg AH. TGF-beta 1 stimulation of cell locomotion utilizes the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan. *J Cell Biol*. 1993;123:749-58.
49. Zhang S, Chang MC, Zylka D, Turley S, Harrison R, Turley EA. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:11342-8.
50. Sussmann M, Sarbia M, Meyer-Kirchrath J, Nüsing RM, Schrör K, Fischer JW. Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. *Circ Res*. 2004;94:592-600.
51. Ohno S, Ijuin C, Doi T, Yoneno K, Tanne K. Expression and activity of hyaluronidase in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol*. 2002;73:1331-7.
52. Dai G, Freudenberger T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, de Groot J, Twarock S, Hanenberg H, Homey B, Krutmann J, Reifenberger J, Fischer JW. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic Acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic Acid synthases. *Am J Pathol*. 2007;171:1451-61.
53. Chhabra ES, Higgs HN. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol*. 2007;9:1110-21.

54. Baumgartner G, Gomar-Höss C, Sakr L, Ulsperger E, Wogritsch C. The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors-- experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy. *Cancer Lett.* 1998;131:85-99.
55. Stern R, Shuster S, Neudecker BA, Formby B. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res.* 2002;276:24-31.
56. Formby B, Stern R. Lactate-sensitive response elements in genes involved in hyaluronan catabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305:203-8.
57. Rudrabhatla SR, Mahaffey CL, Mummert ME. Tumor microenvironment modulates hyaluronan expression: the lactate effect. *J Invest Dermatol.* 2006;126:1378-87.
58. Merzak A, Koocheckpour S, Pilkington GJ. CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Res.* 1994;54:3988-92.
59. Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol.* 1997;182:318-24.
60. Horai S, Kondo R, Murayama K, Hayashi S, Koike H, Nakai N. Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1991;333:409-16; discussion 416-7.
61. Delpech B, Maingonnat C, Girard N, Chauzy C, Maunoury R, Olivier A, Tayot J, Creissard P. Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *Eur J Cancer.* 1993;29A:1012-7.
62. Kudo D, Kon A, Yoshihara S, Kakizaki I, Sasaki M, Endo M, Takagaki K. Effect of a hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, on B16F-10 melanoma cell adhesion and locomotion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321:783-7.
63. Peterson RM, Yu Q, Stamenkovic I, Toole BP. Perturbation of hyaluronan interactions by soluble CD44 inhibits growth of murine mammary carcinoma cells in ascites. *Am J Pathol.* 2000;156:2159-67.
64. Morohashi H, Kon A, Nakai M, Yamaguchi M, Kakizaki I, Yoshihara S, Sasaki M, Takagaki K. Study of hyaluronan synthase inhibitor, 4-methylumbelliferone derivatives on human pancreatic cancer cell (KP1-NL). *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345:1454-9.
65. Kakizaki I, Kojima K, Takagaki K, Endo M, Kannagi R, Ito M, Maruo Y, Sato H, Yasuda T, Mita S, Kimata K, Itano N. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem.* 2004;279:33281-9.
66. Nakamura T, Takagaki K, Shibata S, Tanaka K, Higuchi T, Endo M. Hyaluronic-acid-deficient extracellular matrix induced by addition of 4-methylumbelliferone to the medium of cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;208:470-5.
67. Nakamura T, Funahashi M, Takagaki K, Munakata H, Tanaka K, Saito Y, Endo M. Effect of 4-methylumbelliferone on cell-free synthesis of hyaluronic acid. *Biochem Mol Biol Int.* 1997;43:263-8.
68. Kakizaki I, Takagaki K, Endo Y, Kudo D, Ikeya H, Miyoshi T, Baggenstoss BA, Tlapak-Simmons VL, Kumari K, Nakane A, Weigel PH, Endo M. Inhibition of

- hyaluronan synthesis in *Streptococcus equi* FM100 by 4-methylumbelliferone. *Eur J Biochem.* 2002;269:5066-75.
69. Nakamura T, Ishikawa T, Nanashima N, Miura T, Nozaka H, Nakaoka R, Sato T. 4-Methylumbelliferone induces the expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298:646-50.
70. Yoshihara S, Kon A, Kudo D, Nakazawa H, Kakizaki I, Sasaki M, Endo M, Takagaki K. A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. *FEBS Lett.* 2005;579:2722-6.
71. Nakazawa H, Yoshihara S, Kudo D, Morohashi H, Kakizaki I, Kon A, Takagaki K, Sasaki M. 4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;57:165-70.
72. Tofuku K, Yokouchi M, Murayama T, Minami S, Komiya S. HAS3-related hyaluronan enhances biological activities necessary for metastasis of osteosarcoma cells. *Int J Oncol.* 2006;29:175-83.
73. Hajime M, Shuichi Y, Makoto N, Masanori Y, Ikuko K, Atsushi K, Mutsuo S, Keiichi T. Inhibitory effect of 4-methylesculetin on hyaluronan synthesis slows the development of human pancreatic cancer in vitro and in nude mice. *Int J Cancer.* 2007;120:2704-9.
74. Nakamura R, Kuwabara H, Yoneda M, Yoshihara S, Ishikawa T, Miura T, Nozaka H, Nanashima N, Sato T, Nakamura T. Suppression of matrix metalloproteinase-9 by 4-methylumbelliferone. *Cell Biol Int.* 2007;31:1022-6.
75. Dolorgiet. Fachinformation Cholspamin(R) forte. 2003.
76. Freiburg T. Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Ösophaguskarzinoms. *Leitlinie.* 2001.
77. Baumhoer D, Ramadori G. [Esophageal carcinoma -- current status in diagnosis and therapy]. *Zeitschrift für Gastroenterologie.* 2005;43:399-409.
78. Holmes RS, Vaughan TL. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer. *Seminars in radiation oncology.* 2007;17:2-9.
79. Dawsey SM, Wang GQ, Weinstein WM, Lewin KJ, Liu FS, Wiggett S, Nieberg RK, Li JY, Taylor PR. Squamous dysplasia and early esophageal cancer in the Linxian region of China: distinctive endoscopic lesions. *Gastroenterology.* 1993;105:1333-40.
80. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer.* 2002;38:99-166.
81. Vizcaino AP, Moreno V, Lambert R, Parkin DM. Time trends incidence of both major histologic types of esophageal carcinomas in selected countries, 1973-1995. *Int J Cancer.* 2002;99:860-8.
82. Eloubeidi MA, Mason AC, Desmond RA, El-Serag HB. Temporal trends (1973-1997) in survival of patients with esophageal adenocarcinoma in the United States: a glimmer of hope? *Am J Gastroenterol.* 2003;98:1627-33.
83. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2001;51:15-36.
84. Albertsson M. Chemoradiotherapy of esophageal cancer. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden).* 2002;41:118-23.

85. Sarbia M, Bösing N, Hildebrandt B, Koldovsky P, Gerharz CD, Gabbert HE. Characterization of two newly established cell lines derived from squamous cell carcinomas of the oesophagus. *Anticancer Res.* 1997;17:2185-92.
86. Zhang B, Xia HQ, Cleghorn G, Gobe G, West M, Wei MQ. A highly efficient and consistent method for harvesting large volumes of high-titre lentiviral vectors. *Gene Ther.* 2001;8:1745-51.
87. Carragher NO, Fincham VJ, Riley D, Frame MC. Cleavage of focal adhesion kinase by different proteases during SRC-regulated transformation and apoptosis. Distinct roles for calpain and caspases. *J Biol Chem.* 2001;276:4270-5.
88. Cooray P, Yuan Y, Schoenwaelder SM, Mitchell CA, Salem HH, Jackson SP. Focal adhesion kinase (pp125FAK) cleavage and regulation by calpain. *Biochem J.* 1996;318 ( Pt 1):41-7.
89. Mummert ME, Mohamadzadeh M, Mummert DI, Mizumoto N, Takashima A. Development of a peptide inhibitor of hyaluronan-mediated leukocyte trafficking. *J Exp Med.* 2000;192:769-79.
90. Zvara A, Fajardo JE, Escalante M, Cotton G, Muir T, Kirsch KH, Birge RB. Activation of the focal adhesion kinase signaling pathway by structural alterations in the carboxyl-terminal region of c-Crk II. *Oncogene.* 2001;20:951-61.
91. Wright CS. Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *J Mol Biol.* 1984;178:91-104.
92. Ekblom P, Timpl R. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. A multifaceted approach emerging. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:599-601.
93. Moschos SJ, Drogowski LM, Reppert SL, Kirkwood JM. Integrins and cancer. *Oncology (Williston Park).* 2007;21:13-20.
94. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110:673-87.
95. Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, Armulik A, Lohikangas L. Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci.* 1997;2:d126-46.
96. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:463-518.
97. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999;285:1028-32.
98. Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA, Wehrle-Haller B. Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol.* 2001;155:1319-32.
99. Laukaitis CM, Webb DJ, Donais K, Horwitz AF. Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol.* 2001;153:1427-40.
100. Ginsberg MH, Partridge A, Shattil SJ. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17:509-16.
101. Schaller MD. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1540:1-21.
102. Turner CE. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol.* 2000;2:E231-6.
103. Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene.* 2000;19:5606-13.

104. Walker HA, Whitelock JM, Garl PJ, Nemenoff RA, Stenmark KR, Weiser-Evans MC. Perlecan up-regulation of FRNK suppresses smooth muscle cell proliferation via inhibition of FAK signaling. *Mol Biol Cell*. 2003;14:1941-52.
105. Han EK, McGonigal T. Role of focal adhesion kinase in human cancer: a potential target for drug discovery. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007;7:681-4.
106. McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:505-15.
107. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 1995;9:726-35.
108. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989;49:4682-9.
109. Dehm SM, Bonham K. SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochem Cell Biol*. 2004;82:263-74.
110. Roskoski R, Jr. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331:1-14.
111. Cohen M, Kam Z, Addadi L, Geiger B. Dynamic study of the transition from hyaluronan- to integrin-mediated adhesion in chondrocytes. *Embo J*. 2006;25:302-11.
112. Cohen M, Joester D, Geiger B, Addadi L. Spatial and temporal sequence of events in cell adhesion: from molecular recognition to focal adhesion assembly. *ChemBiochem*. 2004;5:1393-9.
113. Hosono K, Nishida Y, Knudson W, Knudson CB, Naruse T, Suzuki Y, Ishiguro N. Hyaluronan oligosaccharides inhibit tumorigenicity of osteosarcoma cell lines MG-63 and LM-8 in vitro and in vivo via perturbation of hyaluronan-rich pericellular matrix of the cells. *Am J Pathol*. 2007;171:274-86.
114. Ahrens T, Sleeman JP, Schempp CM, Howells N, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Simon JC. Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid. *Oncogene*. 2001;20:3399-408.
115. Mohapatra S, Yang X, Wright JA, Turley EA, Greenberg AH. Soluble hyaluronan receptor RHAMM induces mitotic arrest by suppressing Cdc2 and cyclin B1 expression. *J Exp Med*. 1996;183:1663-8.
116. Carragher NO, Levkau B, Ross R, Raines EW. Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlates with cleavage of pp125(FAK), paxillin, and talin. *J Cell Biol*. 1999;147:619-30.
117. Cohen LA, Guan JL. Mechanisms of focal adhesion kinase regulation. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005;5:629-43.
118. Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, Raines EW. Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J Exp Med*. 1998;187:579-86.
119. Ohno S, Emori Y, Imajoh S, Kawasaki H, Kisaragi M, Suzuki K. Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature*. 1984;312:566-70.
120. Carragher NO, Westhoff MA, Fincham VJ, Schaller MD, Frame MC. A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src. *Curr Biol*. 2003;13:1442-50.

121. Franco SJ, Rodgers MA, Perrin BJ, Han J, Bennin DA, Critchley DR, Huttenlocher A. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol.* 2004;6:977-83.
122. Suzuki K, Sorimachi H. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.* 1998;433:1-4.
123. Glading A, Uberall F, Keyse SM, Lauffenburger DA, Wells A. Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001;276:23341-8.
124. van de Water B, Nagelkerke JF, Stevens JL. Dephosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and loss of focal contacts precede caspase-mediated cleavage of FAK during apoptosis in renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 1999;274:13328-37.
125. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999;71:435-78.
126. Mon NN, Hasegawa H, Thant AA, Huang P, Tanimura Y, Senga T, Hamaguchi M. A role for focal adhesion kinase signaling in tumor necrosis factor-alpha-dependent matrix metalloproteinase-9 production in a cholangiocarcinoma cell line, CCKS1. *Cancer Res.* 2006;66:6778-84.
127. Rothhut B, Ghoneim C, Antonicelli F, Soula-Rothhut M. Epidermal growth factor stimulates matrix metalloproteinase-9 expression and invasion in human follicular thyroid carcinoma cells through Focal adhesion kinase. *Biochimie.* 2007;89:613-24.
128. Assmann V, Marshall JF, Fieber C, Hofmann M, Hart IR. The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. *J Cell Sci.* 1998;111 ( Pt 12):1685-94.
129. Dancey J, Sausville EA. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nature reviews Drug discovery.* 2003;2:296-313.
130. Evanko SP, Wight TN. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J Histochem Cytochem.* 1999;47:1331-42.
131. Grammatikakis N, Grammatikakis A, Yoneda M, Yu Q, Banerjee SD, Toole BP. A novel glycosaminoglycan-binding protein is the vertebrate homologue of the cell cycle control protein, Cdc37. *J Biol Chem.* 1995;270:16198-205.
132. Deb TB, Datta K. Molecular cloning of human fibroblast hyaluronic acid-binding protein confirms its identity with P-32, a protein co-purified with splicing factor SF2. Hyaluronic acid-binding protein as P-32 protein, co-purified with splicing factor SF2. *J Biol Chem.* 1996;271:2206-12.
133. Huang L, Grammatikakis N, Yoneda M, Banerjee SD, Toole BP. Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein. *J Biol Chem.* 2000;275:29829-39.
134. Kirfel G, Herzog V. Migration of epidermal keratinocytes: mechanisms, regulation, and biological significance. *Protoplasma.* 2004;223:67-78.
135. Mogilner A, Edelstein-Keshet L. Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells: a quantitative analysis. *Biophys J.* 2002;83:1237-58.
136. Faix J, Rottner K. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:18-25.
137. Zheng JQ, Wan JJ, Poo MM. Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *J Neurosci.* 1996;16:1140-9.

138. Galbraith CG, Yamada KM, Galbraith JA. Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science*. 2007;315:992-5.
139. Mooseker MS, Tilney LG. Organization of an actin filament-membrane complex. Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol*. 1975;67:725-43.
140. Gorelik J, Shevchuk AI, Frolenkov GI, Diakonov IA, Lab MJ, Kros CJ, Richardson GP, Vodyanoy I, Edwards CR, Klenerman D, Korchev YE. Dynamic assembly of surface structures in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5819-22.
141. Majstoravich S, Zhang J, Nicholson-Dykstra S, Linder S, Friedrich W, Siminovitch KA, Higgs HN. Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology. *Blood*. 2004;104:1396-403.
142. Singer II, Scott S, Kawka DW, Chin J, Daugherty BL, DeMartino JA, DiSalvo J, Gould SL, Lineberger JE, Malkowitz L, Miller MD, Mitnaul L, Siciliano SJ, Staruch MJ, Williams HR, Zweerink HJ, Springer MS. CCR5, CXCR4, and CD4 are clustered and closely apposed on microvilli of human macrophages and T cells. *J Virol*. 2001;75:3779-90.
143. von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell*. 1995;82:989-99.
144. Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisy GG. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*. 2003;160:409-21.
145. Kultti A, Rilla K, Tiihonen R, Spicer A, Tammi R, Tammi M. Hyaluronan synthesis induces microvillus-like cell surface protrusions. *J Biol Chem*. 2006;281:15821-8.
146. Oury T, Hammar S, Roggli V. Ultrastructural features of diffuse malignant mesotheliomas. *Hum Pathol*. 1998;29:1382-92.
147. Oury TD, Hammar SP, Roggli VL. Ultrastructural features of diffuse malignant mesotheliomas. *Hum Pathol*. 1998;29:1382-92.
148. Zu Y, Sidhu G, Wieczorek R, Cassai N. Ultrastructurally "invasive" microvilli in an aggressively metastasizing biphasic malignant mesothelioma. *Ultrastructural pathology*. 2002;26:403-9.
149. Schor SL. Fibroblast subpopulations as accelerators of tumor progression: the role of migration stimulating factor. *EXS*. 1995;74:273-96.

## 9 Veröffentlichungen

### 9.1 Kongressbeiträge

Twarock S., Fischer J.W. (2006). Prostaglandin dependent induction of hyaluronan synthesis is deactivated in esophageal squameous cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372 Suppl 7:93(344)

Van den Boom M., Twarock S., Wetzel W., Rabausch B., Nürnberg B., Schrör K., Fischer J.W. (2006). Migration of vascular smooth muscle cells is dependent on pericellular hyaluronic acid-rich matrix coats and expression of hyaluronic acid synthase-2. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 372 Suppl 7:90(334)

Twarock S., Fischer J.W. (2006). Suppression of Hyaluronidase 2 expression by siRNA inhibits migration and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Vascular Pharmacology*; 186: B18.07.

Twarock S., van den Boom M., Wetzel W., Nürnberg B., Schrör K., Fischer J.W. (2006). Hyaluronic acid synthase-2 supports migration of human vascular smooth muscle cells. *Vascular Pharmacology* 185: B18.03

Twarock S., Nagy N., Fischer J.W. (2007) Effects of the hyaluronansynthase inhibitor 4-methylumbelliferone on esophageal squameous cancer cells *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375 Suppl 1:67(320)

Twarock S., Rabausch B., Schrör K., Fischer J.W. (2007) Hyaluronic acid synthase-2 promotes the proliferative and migratory phenotype of vascular smooth muscle cells *Hämostasologie* 27:1(FV30)

### 9.2 Fachzeitschriften

Dai G, Freudenberger T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, de Groot J, Twarock S., Hanenberg H, Homey B, Krutmann J, Reifenberger J, Fischer JW. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic Acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic Acid synthases. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1451-1461

## 10 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die ideelle und praktische Unterstützung dieser Arbeit. Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Freundin Christine für die liebe Unterstützung und den Rückhalt sowie das Ertragen vieler Nachtschichten und Sinneskrisen bedanken. Danken möchte ich auch meiner Schwester Reidun für die wertvollen Ratschläge und Korrekturen sowie meiner Tante Maria Fahlke für die langjährige Unterstützung vielfältiger Art.

Herrn Prof. Dr. Jens Fischer danke ich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit und die vielen anregende Diskussionen, die stets neue Ideen zu Tage förderten. Besonders möchte ich mich für die Unterstützung in den letzten Wochen vor der Abgabe der Dissertationsschrift bedanken.

Frau Prof. Dr. Læer danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich für die herzliche Aufnahme in das Institut und die ideelle Unterstützung.

Frau Peggy Mann danke ich für die experimentelle Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft sowie für viele schöne Abende.

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich herzlich für die Organisation des Institutslebens.

Allen Kollegen danke ich für die sehr nette Arbeitsatmosphäre am Institut, die sicherlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Andrea Marzoll und Berit Rabausch möchte ich für das Korrekturlesen der Arbeit und die vielen Fragen danken.

Gernot Kaber, Jan Stampfuß und Marcel Tremel möchte ich für eine schöne Zeit und viele wertvolle Diskussionen danken. Außerdem möchte ich Gernot Kaber für die Überlassung des Antikörpers danken.

Herrn Ing. grad. Hans-Jürgen Springer danke ich sehr herzlich für die vielen gemeinsamen Stunden, die wir beim Austüfteln von Versuchsgeräten zugebracht haben. Insbesondere sei das Chromatographie-Steuerungs-Gerät zu nennen, ohne das der Versuch nicht möglich gewesen wäre.

Der Entrepreneurs Foundation Düsseldorf danke ich für die finanzielle Förderung dieses Projekts.

## **11 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 13. Dezember 2007

Sören Twarock

## 12 Lebenslauf

Name: Sören Twarock

Wohnort: Margaretastr. 8, 50827 Köln

Geburtsdatum: 3. Juni 1978

Geburtsort: Köln

Eltern: Dr. Herbert Twarock, Apotheker und Lebensmittelchemiker  
Dr. Brunhild Twarock-Bergt, Apothekerin und Ärztin

Geschwister: Dr. Reidun Twarock, Professorin für biologische Mathematik

Staats-  
angehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1984 – 1988: Wilhelm-Schreiber-Grundschule in Köln-Ossendorf  
1988 – 1997: Friedrich-Wilhelm-Gymnasium in Köln  
1997: Abitur

Studium: WS 1997/98– SS 2002:  
Pharmaziestudium an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
März 2000:  
1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
September 2002:  
Abschluß des Universitätsstudiums mit dem  
2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Praktikum: Oktober 2002 – April 2003:  
Pharmaziepraktikum in der Margareta-Apotheke, Köln  
Mai 2003 – Oktober 2003:  
Wissenschaftliche Tätigkeiten im Rahmen des Praktischen  
Jahres im Pharmakologischen Institut der Universität zu Köln

Approbation als  
Apotheker: Januar 2004 mit dem  
3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Wissenschaftliche  
Tätigkeiten:      Februar 2004 – Dezember 2004  
Wissenschaftliche Tätigkeiten im Rahmen der Dissertation  
im Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der  
Universität Düsseldorf

Januar 2005 – Mai 2007  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und  
klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf im Rahmen  
eines Promotionsstipendiums der Gesellschaft der Freunde und  
Förderer der Universität Düsseldorf „Gründerstiftung“

Juni 2007 – Dezember 2007  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und  
klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf