

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

**Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer**

**Untersuchungen zur Regulation und therapeutischen Beeinflussbarkeit des  
extrazellulären Hyaluronsäuresystems  
in humanen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus  
anhand eines in vivo Modells**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**Vorgelegt von**

**Eva Rieth, geb. Poscher**

**2013**

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

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

Koreferent: Prof. Dr. med. Bernhard Homey

**Veröffentlichung:**

Twarock S, Freudenberger T, Poscher E, Dai G, Jannasch K, Dullin C, Alves F, Prenzel K, Knoefel WT, Stoecklein NH, Savani RC, Homey B and Fischer JW.

**Inhibition of Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Progression by *in vivo* Targeting of Hyaluronan Synthesis.** *Mol Cancer*. 2011 Mar 23; 10:30

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Das Ösophaguskarzinom</b>	<b>1</b>
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Ätiologie	1
1.1.3	Epidemiologie	4
1.1.4	Prognose	4
1.1.5	Therapie	5
1.2	<b>Hyaluronsäure</b>	<b>6</b>
1.2.1	Struktur und Funktion	6
1.2.2	Mit einer pathologischen Veränderung der Hyaluronsäuresysteme assoziierte Erkrankungen	8
1.2.3	Hyaluronsäure in der Karzinogenese	10
1.3	<b>Der Hyaluronsäureinhibitor 4-Methyl-Umbelliferon</b>	<b>14</b>
1.3.1	Struktur und Vorkommen	14
1.3.2	Wirkungsmechanismus	15
1.3.3	Geschichte des 4-Methyl-Umbelliferon als Hyaluronsäureinhibitor und seine Anwendung in der Karzinogeneseforschung	17
1.3.4	Wirksamkeit und Sicherheit	19
1.4	<b>Zielsetzung</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	<b>Substanzen</b>	<b>21</b>
2.2	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>22</b>
2.3	<b>Antikörper</b>	<b>22</b>
2.4	<b>Geräte und Verbrauchsmaterial</b>	<b>23</b>
2.5	<b>NMRI nu/nu Mäuse</b>	<b>24</b>
2.6	<b>Futtermittel</b>	<b>24</b>
2.7	<b>OSC-1 Zellen</b>	<b>25</b>
2.8	<b>Tierversuch/ Aufbau</b>	<b>26</b>
2.8.1	4-MU Versuch	26
2.8.2	Lentiviraler Knockdown von HAS-3	26
2.9	<b>Gewebeentnahme und Gewebeaufarbeitung</b>	<b>27</b>
2.10	<b>Anfertigung von Gefrierschnitten</b>	<b>27</b>
2.11	<b>Hämalaun-Eosin-Färbung</b>	<b>27</b>
2.12	<b>Immunhistochemische Färbungen</b>	<b>28</b>
2.12.1	Zytokeratin 18, Alpha-smooth-muscle-Actin, CD31	28
2.12.2	Hyaluronsäurefärbung	28
2.12.3	Anti- Ki67, Anti-CD44H	29
2.12.4	RHAMM Färbung	29
2.13	<b>Auswertung der Hämalaun-Eosin-Färbung</b>	<b>30</b>

<b>2.14</b>	<b>Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....</b>	<b>30</b>
2.14.1	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Hyaluronsäure und CD31 .....	31
2.14.2	Auswertung der Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 .....	32
<b>2.15</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>32</b>
<b>2.16</b>	<b>Lentivirale Ausschaltung der HAS3-mRNA-Expression .....</b>	<b>33</b>
2.16.1	Beschreibung des lentiviralen Systems.....	33
2.16.2	Vermehrung der Plasmide .....	34
2.16.3	Produktion der Lentiviren .....	34
2.16.4	Infektion der Zielzellen .....	34
2.16.5	Tierversuch .....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>4-MU Gruppe.....</b>	<b>35</b>
3.1.1	Einfluss von 4-MU auf das Wachstum von OSC1-Tumorgewebe... 35	
3.1.2	Einfluss von 4-MU auf die Morphologie von OSC1-Tumorgewebe. 36	
3.1.3	Einfluss von 4-MU auf die Verteilung von Hyaluronsäure und den Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM in OSC-1 Tumorgewebe.....	39
3.1.4	Inhibitorische Effekte von 4-MU auf die Proliferation von OSC1-Zellen in vivo .....	42
3.1.5	Einfluss von 4-MU auf die Vaskularisierung von OSC1-Tumorgewebe .....	44
<b>3.2</b>	<b>shHAS3 .....</b>	<b>46</b>
3.2.1	Einfluss der lentiviralen Ausschaltung der Genexpression von HAS3 auf das Wachstum von OSC1-Tumorgewebe .....	46
3.2.2	Einfluss der lentiviralen Ausschaltung der Genexpression von HAS3 auf die Morphologie von OSC1-Tumorgewebe .....	47
3.2.3	Einfluss der lentiviralen Ausschaltung der HAS3 Genexpression auf die Verteilung von Hyaluronsäure und den Hyaluronsäure-Rezeptoren CD44 und RHAMM in OSC-1 Tumorgewebe.....	50
3.2.4	Inhibitorische Effekte der lentiviralen Ausschaltung der HAS3 Genexpression auf die Proliferation von OSC1-Zellen in vivo .....	53
3.2.5	Einfluss der lentiviralen Ausschaltung der HAS3 Genexpression auf die Vaskularisierung von OSC1-Tumorgewebe .....	55
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Bedeutung der Hyaluronsäure in der Tumorprogression, der Ausbildung des Tumorphänotyp und der Proliferation .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Bedeutung der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM in OSC1- Ösophaguskarzinomen.....</b>	<b>59</b>
<b>4.3</b>	<b>Vergleich von 4-MU und shHAS3 Effekten.....</b>	<b>60</b>
<b>4.4</b>	<b>Bedeutung der Hyaluronsäure für die Vaskularisierung des Tumorgewebes.....</b>	<b>62</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>65</b>

4.6	Fazit .....	66
5	Zusammenfassung.....	67
6	Summary .....	68
7	Abkürzungsverzeichnis .....	69
8	Literaturverzeichnis .....	71
9	Eidesstattliche Erklärung .....	78
10	Danksagung .....	79
11	Lebenslauf.....	81

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Ösophaguskarzinom

### 1.1.1 Definition

Das Ösophaguskarzinom stellt eine maligne Neoplasie der Speiseröhre dar.

Dabei handelt es sich heute in ca. 60-70 % der Fälle histologisch um Plattenepithelkarzinome, die besonders im mittleren, weniger im oberen Ösophagusdrittel auftreten (Verhältnis ca. 1:3). Histologisch treten 30-40 % der Ösophaguskarzinome als Adenokarzinome in Erscheinung, welche vor allem im terminalen Ösophagusdrittel zu finden sind. In weniger als 5 % aller malignen Ösophagusneoplasien handelt es sich um anaplastische oder kleinzellige Karzinome, Karzinoide und Leiomyosarkome (Freiburg 2001). Insgesamt sind 15 % aller Ösophaguskarzinome im oberen, 45-50 % im mittleren und 35-40 % im unteren/terminalen Ösophagusdrittel lokalisiert.

### 1.1.2 Ätiologie

Zu den speziellen Risikofaktoren für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zählen vor allem ein chronischer Nikotinabusus und der regelmäßige Genuss von konzentriertem Alkohol (Cancer 1988; Znaor et al. 2003). Weitere Risikofaktoren sind heiße Getränke (Baumhoer and Ramadori 2005), Nitrosamine (Baden et al. 2006), der Genuss von Bethelnüssen (Wu et al. 2001) sowie eine Obst- und Gemüsearme Ernährung (Baumhoer and Ramadori 2005).

Die Risikofaktoren für ein Adenokarzinom des Ösophagus umfassen vor allem die gastroösophageale Refluxerkrankung (GERD) sowie Übergewicht und männliches Geschlecht (Baumhoer and Ramadori 2005). Adenokarzinome im terminalen Ösophagus entsprechen in der Regel vorgewachsenen Kardiakarzinomen des Magens oder entstehen auf dem Boden der Präkanzerose Barrett-Ösophagus. Dieser wird durch eine persistierende Säureeinwirkung im Rahmen der Refluxerkrankung ausgelöst und entsteht durch einen metaplastischen Umbau von Plattenepithel zu Zylinderepithel im terminalen Teil des Ösophagus.

Weitere ätiologisch wichtige Faktoren bei der Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms stellen die Achalasie (Leeuwenburgh et al. 2010), ein Zustand nach Bestrahlung der Ösophagusregion (z.B. bei Mamma-Karzinom), die Infektion

mit humanen Papillomaviren 16 & 18 (Li et al. 2009) und genetische Faktoren bei der autosomal-dominant vererbten *Tylosis palmaris et plantaris* (Howel-Evans et al. 1958; Shine and Allison 1966) dar.

Einen wichtigen, die Prognose bestimmenden Faktor im Verlauf der Karzinogenese, stellt die Eindringtiefe des Karzinoms in die Speiseröhrenwand dar. Sie korreliert direkt mit der lymphogenen Metastasierungshäufigkeit, einem wichtigen prognostischen Parameter (Baumhoer and Ramadori 2005). Ösophaguskarzinome werden von der *Union internationale contre le cancer* (UICC) in der 7. Auflage von Dezember 2009 wie folgt klassifiziert:

<b>Grading von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus</b>	
G1	Reichlich Verhornung, gut erkennbare Interzellularbrücken, deutliche Schichtung der tumorösen Epithelverbände
G2	Zwischenstellung zwischen G1 und G3
G3	Verhornung, Interzellularbrücken und Schichtung nur gering ausgeprägt oder vollständig fehlend

*Tabelle 1-1 Grading von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus*

<b>Grading von Adenokarzinomen des Ösophagus</b>	
G1	Adenokarzinome mit gleichförmiger drüsiger Struktur, die häufig einem metaplastischen intestinalen Epithel ähneln
G2	Strukturell weder ähnlich G1 noch G3
G3	Adenokarzinome, die entweder aus irregulären, kaum erkennbaren Drüsen oder aus einzelnen Zellen, die in kleinen oder größeren Ballen angeordnet sind, z.T. mit Schleimbildung und Resten drüsiger Strukturen, bestehen

*Tabelle 1-2 Grading von Adenokarzinomen des Ösophagus*



<b>Definition der T-/ N-/ M- Kategorie für Karzinome des Ösophagus</b>	
Tis	Karzinoma in situ/ High-grade Dysplasie/ hochgradige intraepitheliale Neoplasie
T1	<i>Lamina propria, Muscularis mucosae</i> oder <i>submucosa</i> infiltriert
T1a	<i>Lamina propria</i> oder <i>Lamina muscularis mucosae</i> infiltriert
T1b	Submukosa infiltriert
T2	<i>Muscularis propria</i> infiltriert
T3	<i>Adventitia</i> infiltriert
T4	Benachbarte Strukturen infiltriert
T4a	Pleura, Perikard, Zwerchfell oder angrenzendes Peritoneum infiltriert
T4b	Andere Nachbarstrukturen infiltriert: z.B. Aorta, Wirbelkörper, Trachea
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	1-2 regionale, einseitige Lymphknoten befallen
N2	3-6 regionale Lymphknoten befallen
N3	≥ 7 regionale Lymphknoten befallen
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1-3 TNM Klassifikation = UICC Klassifikation des Ösophaguskarzinoms

<b>Stadiengruppierung Ösophagus</b>			
Stadium I A	T1	N0	M0
Stadium I B	T2	N0	M0
Stadium II A	T3	N0	M0
Stadium II B	T1, T2	N1	M0
Stadium III A	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T1, T2	N2	M0
Stadium III B	T3	N2	M0
Stadium III C	T4a	N1, N2	M0
	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 1-4 Anatomische Stadieneinteilung von Adeno- & Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus nach UICC

Die Einnahme von Acetylsalicylsäure/ nicht steroidalen Antirheumatika scheint einen gewissen protektiven Effekt zu haben, wobei die Datenlage nicht eindeutig ist (Szumilo et al. 2009).

### **1.1.3 Epidemiologie**

Die Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms 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 3-8 Fällen / 100.000 Einwohner und Jahr auftritt (Herold 2009). Weltweit zeigt sich eine besonders starke Häufung in China (ca. 130 Fälle / 100.000 per annum), dem Iran, Süd- und Ostafrika und Nordfrankreich (Dawsey et al. 1993; Bray et al. 2002; Vizcaino et al. 2002). 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 Vielfaches angestiegen. Jährlich nimmt man eine Zunahme der Inzidenz des Adenokarzinoms des Ösophagus von 10% an. Bei Männern <50 Jahren ist das Adenokarzinom mittlerweile die häufigste Entität unter den Ösophaguskarzinomen (Freiburg 2001).

Männer sind häufiger als Frauen betroffen (Geschlechterverhältnis etwa 5:1); dunkelhäutige Menschen öfter als Kaukasier (Verhältnis ca. 2:1). Der Altersgipfel liegt zwischen dem 65. und dem 70. Lebensjahr (Holmes and Vaughan 2007).

### **1.1.4 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 (Eloubeidi et al. 2003). Weniger als 10% aller Ösophaguskarzinome werden in einem Stadium UICC I diagnostiziert. Bei der überwiegenden Zahl der Patienten liegt bei Diagnosestellung bereits ein lokal fortgeschrittenes Karzinom vor.

Eine Resektion mit kurativer Intention gelingt nur in 30% der Fälle; die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt dann 10 - 25% (Freiburg 2001). 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 (Greenlee et al. 2001; Bray et al. 2002). Die

mittlere Überlebensrate liegt bei 9 Monaten ab Diagnosestellung, bei Lymphknotenmetastasierung beträgt sie 6 Monate (Albertsson 2002; Eloubeidi et al. 2003).

Die ungünstige Prognose ergibt sich aus der schnellen und frühen Metastasierung dieser Tumorentität bei gleichzeitiger Symptomarmut der frühen Krankheitsstadien. Uncharakteristische Symptome, die auftreten können, sind vor allem Dysphagie im Alter über 40 Jahren, Gewichtsverlust, Regurgitation, Pseudohypersalivation (aufgrund von Unfähigkeit den Speichel bei stenosierendem Vorgang zu schlucken) sowie Schmerzen retrosternal und im Rücken (Herold 2009).

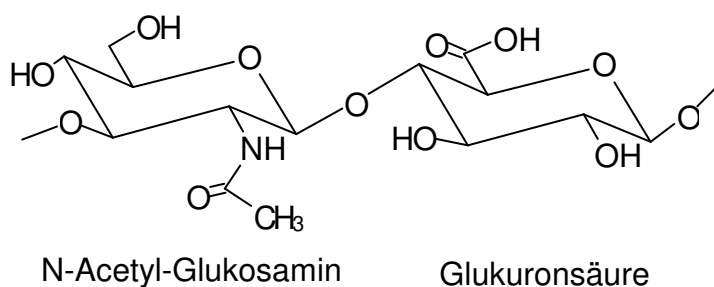
### **1.1.5 Therapie**

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 (Baumhoer and Ramadori 2005). 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 Verfahren scheint eine sinnvolle, wenn auch moderat wirksame, zusätzliche Behandlungsoption zu sein (Baumhoer and Ramadori 2005). 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 (Baumhoer and Ramadori 2005).

## 1.2 Hyaluronsäure

### 1.2.1 Struktur und Funktion

Hyaluronsäure gehört zu der Gruppe der Glykosaminoglykane und besteht aus Disaccharideinheiten aus N-Azetyl-Glukosamin und Glukuronsäure, die  $\beta(1-4)$  bzw.  $\beta(1-3)$  verknüpft sind (**Abbildung 1-1**). Es handelt sich um ein unverzweigtes Polysaccharid, welches in einer breiten Größenvariabilität auftritt, welche von wenigen Disaccharid-Einheiten bis zu mehr als  $10^5$  Disacchariden, entsprechend  $10^7$  Dalton Molekulargewicht, reicht (Stern et al. 2006).



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

Hyaluronsäure wird von drei membranständigen Isoenzymen der Hyaluronsäuresynthase (HAS 1-3) aus den beiden oben genannten Bestandteilen synthetisiert (Itano and Kimata 2002). Damit unterscheidet sie sich von den anderen Glykosaminoglykanen wie Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat, Keratansulfat und Heparin, welche alle sulfatiert vorliegen und im Endoplasmatischen Retikulum bzw. dem Golgi-Apparat produziert werden. Der Sekretionsmechanismus für Hyaluronsäure in den Extrazellulärraum ist noch nicht abschließend untersucht. Derzeit werden zwei Thesen diskutiert: Zum Einen, dass die entstehenden Hyaluronsäureketten im gleichen Schritt von den HAS-Enzymen in den Extrazellulärraum extrudiert werden (Itano and Kimata 2002); zum Anderen, dass diese Hyaluronsäureketten über einen ABC-Transporter (MRP-5) in den Extrazellulärraum transportiert (Schulz et al. 2007) werden. Gerade letztere These wird kontrovers diskutiert (Rygaard and Povlsen 1969; Thomas and Brown 2010). Neben Kollagen stellt Hyaluronsäure einen Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix

dar. Sie erfüllt eine Reihe wichtiger Funktionen, die sich grob in mechanische und biochemische bzw. zellbiologische Aufgaben unterteilen lassen:

Die *mechanischen Funktionen* der Hyaluronsäure lassen sich durch ihre ausgeprägte Wasserbindungsfähigkeit erklären, welche durch die vielen negativen Ladungen des Moleküls zustande kommt. Daraus resultiert sowohl das ausgeprägte Quellvermögen der Hyaluronsäure als auch eine starke Hydratisierung der Gewebe. Im menschlichen Körper besteht das Innere des Augapfels zu 98% aus Wasser, welches an 2% Hyaluronsäure gebunden vorliegt (Meyer K. 1934).

Auch erfüllt die Hyaluronsäure aufgrund der Tatsache, dass das eingelagerte Wasser nicht komprimierbar ist, eine stützende bzw. strukturgebende Aufgabe im Binde- und Stützgewebe. Dieser strukturgebende Effekt ist in den *Nuclei pulposi*, den Gallertkernen der Bandscheiben (Inkinen et al. 1999; Melrose et al. 2002), und in der Synovia, der Gelenkflüssigkeit, zu beobachten.

Als weitere mechanische Eigenschaft sei noch auf die Funktion der Hyaluronsäure in der Zellwanderung hingewiesen. Durch eine vermehrte Hyaluronsäureproduktion wird ein Raum im Zellverband eröffnet, in den sich die migrierende Zelle hineinbewegen kann. Diesen Mechanismus benutzen in verstärktem Maße auch Tumorzellen (Toole 2002; Toole and Hascall 2002).

Den *biochemischen und zellbiologischen Funktionen* der Hyaluronsäure ist in den letzten Jahrzehnten wachsende Aufmerksamkeit gewidmet worden. Hier sind besonders die vielfältigen Wechselwirkungen der Hyaluronsäure mit anderen Matrixbestandteilen zu nennen.

Hyaluronsäure bindet 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*). Dadurch unterstützt sie die Ausbildung einer stark vernetzten perizellulären Hyaluronsäurematrix (Day and Prestwich 2002).

Der zweite Aspekt der zellbiologischen Funktionen der Hyaluronsäure bezieht sich auf die spezifischen Ligand-Rezeptor-Interaktionen mit den in der Regel membranständigen Hyaluronsäurerezeptoren. In diesem Kontext spielen die Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM (Rezeptor für Hyaluronsäure medierte Motilität) die wichtigste Rolle (Entwistle et al. 1996; Turley et al. 2002; Twarock et al. 2010).

Ein weiterer für nachfolgende Forschung relevanter Aspekt ist die Funktion der Hyaluronsäure in der Signalvermittlung zwischen einzelnen Zellen bzw. im Falle eines Tumors zwischen der Krebszelle und den Stromazellen. So hängt die Funktion der Hyaluronsäure maßgeblich von der Größe der synthetisierten Hyaluronsäuremoleküle ab (Stern et al. 2006). Kleine Hyaluronsäuremoleküle in der Größenordnung von wenigen Disacchariden vermitteln immunogene, inflammatorische und migrationsfördernde Prozesse (Termeer et al. 2000; Termeer et al. 2002; Xu et al. 2002; Sugahara et al. 2003; Taylor et al. 2004), während größere Moleküle, unter anderem ein 20 kDa großes Hyaluronsäuremolekül, als wichtige Stimuli für die Angiogenese identifiziert wurden (West et al. 1985; Sattar et al. 1994; Slevin et al. 2002; Slevin et al. 2007). Dem gegenüber steht die Erkenntnis, dass hochmolekulare Hyaluronsäure im Bereich zwischen  $10^5$  und  $10^7$  Dalton die Angiogenese unterdrückt (Feinberg and Beebe 1983) und immunsuppressive Funktionen erfüllt (McBride and Bard 1979; Delmage et al. 1986), aber möglicherweise auch an Prozessen wie Migration und Proliferation beteiligt ist (Knudson and Knudson 1993).

### **1.2.2 Mit einer pathologischen Veränderung der Hyaluronsäuresysteme assoziierte Erkrankungen**

Eine ganze Reihe von Krankheitsbildern beruht auf pathologischen Veränderungen von Hyaluronsäure-abhängigen Prozessen.

*In vitro* Daten geben Hinweise darauf, dass eine starke Stimulation der Hyaluronsäuresynthasen HAS1 und HAS2 durch Makrophagen eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt, indem freigesetztes Prostaglandin  $E_2$  zu einer vermehrten Anreicherung von Hyaluronsäure im perizellulären Raum führt und dadurch die Migration glatter Gefäßmuskelzellen in die atherosklerotische Plaque stattfinden kann (Sussmann et al. 2004).

Auch bei anderen Entzündungen im Körper, wie z.B. einer Gingivitis oder Parodontitis, scheint ein durch Hyaluronsäurefragmente unterhaltenes Entzündungsgeschehen beteiligt zu sein (Ohno et al. 2002).

Ein weiteres klassisches Gebiet in der Hyaluronsäureforschung ist die Dermatologie. Diese beschäftigt sich vorwiegend mit der Hautalterung und den damit verbundenen Dehydratations- und Degenerationsprozessen in den verschiedenen Schichten der Haut (Dai et al. 2007). Eine Abnahme dermalen Hyaluronsäure scheint besonders bei

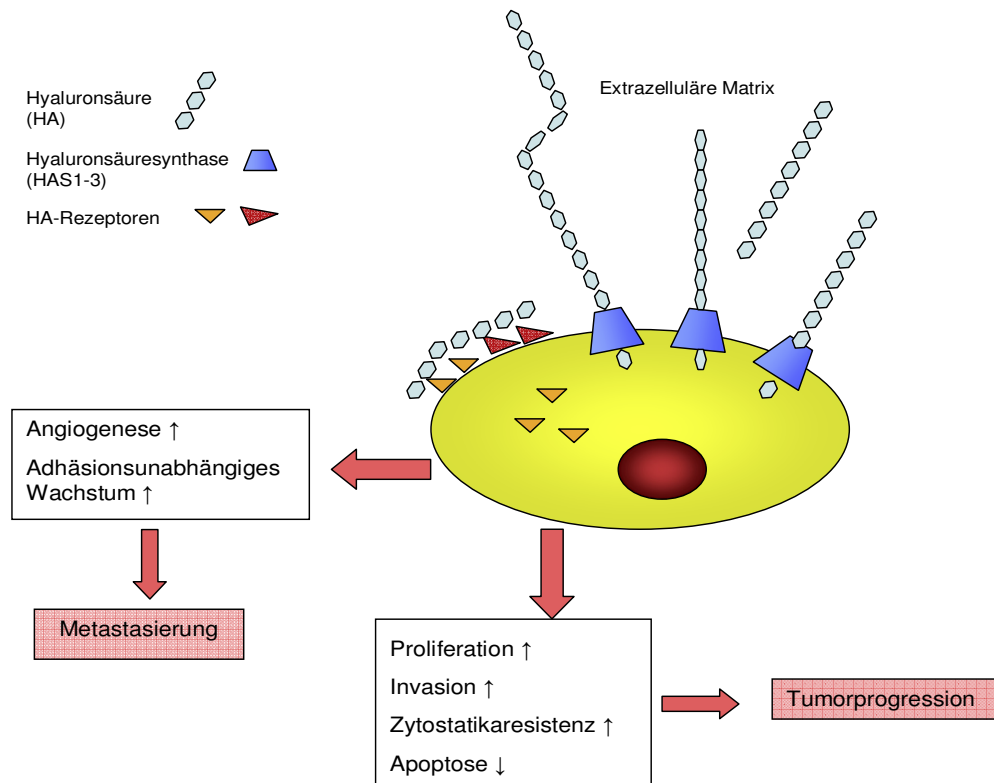
topischer Applikation von Glukokortikoiden eine besondere Rolle in der vorzeitigen Hautalterung zu spielen (Gebhardt et al. 2010).

Auch auf dem Gebiet der orthopädischen Forschung spielt die Hyaluronsäure eine bedeutende Rolle. Hyaluronsäure nimmt eine wichtige Stellung in der Entstehung der Osteoarthritis ein, in dem die Verarmung der *Synovia* (für die Bedeutung der Hyaluronsäure in der *Synovia* siehe 1.2.1) an Hyaluronsäure einen pathophysiologischen Schlüsselprozess darstellt (Fam et al. 2007). Die physiologische Abnahme der Hyaluronsäure in zunehmendem Lebensalter und die damit verbundene Abnahme der „Gelenkschmiere“ stellt ein typisches Korrelat für die Entstehung einer Osteoarthritis mit Erosion des ebenfalls zum Teil aus Hyaluronsäure bestehenden Knorpels dar. Es kommt zu einer Umbildung des knorpelnahe Knochens mit Verschmälerung des Gelenkspaltes, Osteophytenbildung, Entstehung von Geröllzysten und einer Vergrößerung der Sklerosierungszone. Damit einher gehen Schmerzen, Schwellungen, Bewegungseinschränkungen und Deformationen bzw. Fehlstellungen der betroffenen Gelenke. Desweiteren scheint es zu einem vermehrten Abbau der hochmolekularen Hyaluronsäureketten durch Hyaluronidasen zu den bereits erwähnten proinflammatorischen Hyaluronsäurefragmenten zu kommen, welche zu einer Veränderung der erythrozytären Flusseigenschaften und einer zusätzlichen Exazerbation des Grundgeschehens beitragen (Luquita et al. 2010).

Auch im Kontext der Verarmung der Bandscheiben bzw. der *Nuclei pulposi* (für die Bedeutung der Hyaluronsäure in den *Nuclei pulposi* siehe 1.2.1) an Hyaluronsäure spielt diese in der Forschung eine wichtige Rolle. In neueren Studien wird unter anderem versucht, Hyaluronsäure in der Entwicklung von „künstlichen“ Bandscheiben bzw. *Nuclei pulposi* einzusetzen (Nesti et al. 2008; Huang et al. 2010; Li et al. 2010).

### 1.2.3 Hyaluronsäure in der Karzinogenese

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Tumorgenese, einem weiteren sehr bedeutenden Feld der Hyaluronsäureforschung. Die Hyaluronsäure erfüllt in diesem Kontext eine Vielzahl an Funktionen, welche im Folgenden beschrieben werden:



**Abbildung 1-2** Die Bedeutung der Hyaluronsäure für die Tumorprogression

Vermehrte Hyaluronsäureproduktion der Tumorzelle bietet die Grundlage für jede Zellbewegung und somit eine wichtige Möglichkeit, die Migration zu steigern und invasiv in Fremdgewebe einzuwachsen (Toole 2002; Toole and Hascall 2002; Sugahara et al. 2003; Twarock et al. 2010). Nach einer Sondierung der Wanderungsrichtung durch verschiedene Zellfortsätze wie Filopodien, Mikrospikes oder Mikrovilli (Chhabra and Higgs 2007) beginnt die Zelle, vermehrt Hyaluronsäure zu produzieren, um in ihrer direkten Umgebung eine leichter zu durchwandernde Extrazellulärmatrix zu schaffen (Toole 2002; Toole and Hascall 2002; Twarock et al. 2010). In Wanderungsrichtung bilden sich fokale Adhäsionskomplexe, während sie auf der gegenüberliegenden Seite degradiert werden. In einem zweiten Schritt extrudiert die Zelle gerichtet Hyaluronsäure, um sich vom Substrat abzulösen.



Die Zelle nutzt Hyaluronsäure einerseits, um sich ihren Weg durch das Gewebe und die Extrazellulärmatrix zu bahnen und andererseits, um sich aus dem Zellverband abzulösen. Gleichzeitig stimuliert die abgegebene Hyaluronsäure die Hyaluronsäurerezeptoren RHAMM und CD44, die ihrerseits zu einer verstärkten Migration führen. CD44 ist der erste Oberflächen-Hyaluronsäurerezeptor, der entdeckt wurde (Underhill et al. 1987). Er besitzt eine weite Verbreitung u.a. auf hämatopoetischen Stammzellen, Fibroblasten und Tumorzellen. Der CD44-Rezeptor erfüllt verschiedenartige Aufgaben in der Lymphozytenaktivierung und -bewegung, der Hämatopoese, der Zellaggregation und Zytokinausschüttung. In der Tumorgenese vermittelt CD44 vor allem Metastasierung und Anheftung (Haynes et al. 1989; Haynes et al. 1991; Lesley et al. 2000; Ghatak et al. 2002; Ward et al. 2003). RHAMM wurde als zweiter Hyaluronsäurerezeptor entdeckt und ist sowohl in der Zellmembran als auch im Zytoplasma lokalisiert (Entwistle et al. 1995). RHAMM reguliert die Zellmotilität (Hardwick et al. 1992) und den Umsatz der fokalen Adhäsionen (Hall et al. 1994; Hall and Turley 1995). RHAMM konnte auch als Spindelprotein während der Mitose von Zellen identifiziert werden und scheint in humanen Tumorentitäten überexprimiert zu werden (Tolg et al. 2010).

Ein weiterer von der Tumorzelle genutzter Mechanismus ist die Produktion eines Hyaluronsäuremantels, der zweierlei Aufgaben erfüllen kann:

Zum einen bietet er der Tumorzelle Schutz vor exogen zugeführten Noxen wie z.B. Chemotherapeutika, indem er eine Diffusionsbarriere für eine Vielzahl von Molekülen darstellt. Vor diesem Hintergrund wird in der klassischen Chemotherapie bereits seit langer Zeit Hyaluronidase eingesetzt, um diesen Mantel zu verdauen und auf diesem Wege die Chemotherapieresistenz zu verringern (Baumgartner et al. 1998).

Zum anderen wird durch diesen Hyaluronsäuremantel der membranständige Hyaluronsäurerezeptor CD44 stimuliert und über den nachgeschalteten Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) – Proteinkinase B (AKT) Signalweg die nachlassenden Integrin-vermittelten Signale der fokalen Adhäsionskomplexe ausgeglichen. Hierdurch wird eine ablösungsbedingte Apoptose, die Anoikis, verhindert (Ghatak et al. 2002; Ward et al. 2003). Folge ist eine hämatogene Metastasierung der Tumorzelle zum Teil über die vorher durch Angiogenese neu gebildeten Blutgefäße.

Des Weiteren beeinflusst eine Tumorzelle durch Hyaluronsäure die nicht neoplastisch veränderten Stromazellen in der Umgebung:

Zum einen spielen die Hyaluronsäure abbauenden Isoenzyme, die Hyaluronidasen (HYAL) 1-3 eine wichtige Rolle. Sie produzieren die besonders aktiven niedermolekularen Hyaluronsäuremoleküle, welche z.B. zu einer Suppression der Apoptose, einer vermehrten Transkription von Matrix-metallo-Proteinasen (MMPs), einer Stimulation der Tumorneovaskularisierung, einer Förderung der Angiogenese durch Stimulation von Endothelzellen und zu einer Begünstigung der Tumorzellmigration führen (Stern 2004; Stern et al. 2006). Von diesen genannten Prozessen ist besonders die Neoangiogenese als ein Schlüsselmechanismus bei der malignen Entartung einer Krebszelle zu nennen.

Einen weiteren Stimulus der Tumorzellen an die Stromazellen stellt die Ausnutzung der aeroben Glykolyse (so genannter Warburg-Effekt) dar. Fast alle Tumorentitäten weisen aerobe Glykolyse, bei der es zu einer erhöhten Laktatproduktion kommt, auf. Das entstehende Laktat fungiert als ein Stimulus für die Hyaluronsäuresynthese und veranlasst die Stroma-Zellen dazu, für den wachsenden Tumor vermehrt Hyaluronsäure als Matrix zur Verfügung zu stellen. Die auf diesem Wege gebildete Hyaluronsäurematrix fördert wiederum die Tumorgenese (Stern et al. 2002; Formby and Stern 2003; Rudrabhatla et al. 2006).

Bei einer Vielzahl von Tumoren und Tumorzelllinien lässt sich eine starke Hyaluronsäureproduktion nachweisen. Diese ist meist gepaart mit einer starken Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 (Delmage et al. 1986; Horai et al. 1991; Merzak et al. 1994; Ropponen et al. 1997; Toole 2002). Dies trifft auch auf die in vorliegender Arbeit untersuchten ösophagealen humanen Plattenepithelkarzinomzellen zu, wie immunhistochemische Färbungen zeigen (Twarock et al. 2009).

In vielen Publikationen konnte gezeigt werden, dass es unter einer Inhibition der Hyaluronsäureproduktion oder einer Blockade des Hyaluronsäurerezeptors CD44 zu einer signifikanten Reduktion des invasiven Zellwachstums von Tumorzellen kommt (Merzak et al. 1994; Toole 2002). Einerseits lässt dies auf eine erhebliche Bedeutung der Hyaluronsäure für die Entwicklung eines malignen Phänotyps, andererseits aber auch auf eine Beeinflussbarkeit dieses Systems, schließen.

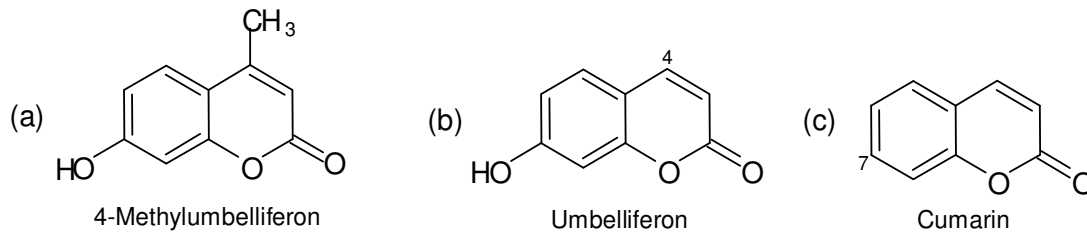
2010 veröffentlichten Twarock et al. eine *in vitro* Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass Hyaluronsäure in humanen Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus zu einer Stabilisierung von fokalen Adhäsionskomplexen sowie zur Ausbildung und

Stabilisierung von Filopodien zur Beweglichkeit der Zellen führt. Auch konnten sie zeigen, dass Hyaluronsäure zu einem stark proliferierenden Phänotyp der untersuchten Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus beiträgt (Twarock et al. 2010). Diese Arbeit diene als Grundlage für die vorliegende weiterführende *in vivo* Untersuchung an Xenotransplantaten derselben Zelllinie.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Hyaluronsäure eine wichtige Schaltstelle in der Tumorprogression darstellt. So scheint es, dass eine gerichtete Beeinflussung der beschriebenen Prozesse ein potenter therapeutischer Ansatzpunkt sein könnte.

## 1.3 Der Hyaluronsäureinhibitor 4-Methyl-Umbelliferon

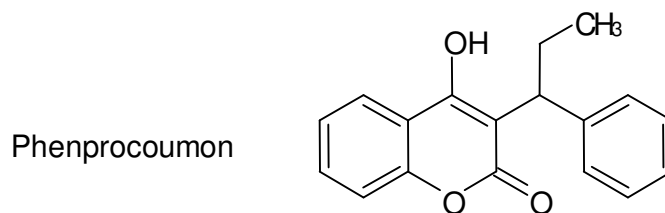
### 1.3.1 Struktur und Vorkommen



**Abbildung 1-3** Formeln von (a) 4-Methylumbelliferon und seinen Vorstufen (b) Umbelliferon und (c) Coumarin

4-Methylumbelliferon (4-MU) ist ein an Position 4 methyliertes Umbelliferon (siehe **Abbildung 1-3 a**). Umbelliferon findet sich als auftretender Inhaltsstoff in unserer heimischen Flora, z.B. in *Angelica archangelica*, *Matricaria recutita*, *Daphne mezereum*, *Levisticum officinale* u.v.a mit auffälliger Häufung in der Familie der Apiaceae. Diese Gattung wurde früher aufgrund ihrer Blütenstände Umbelliferen genannt und stellen somit die Namensgeber dieser Verbindung dar.

Umbelliferon wird durch eine Hydroxylierung an Position 7 des Coumarin-Grundgerüsts gebildet (siehe **Abbildung 1-3 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 Antikoagulant.

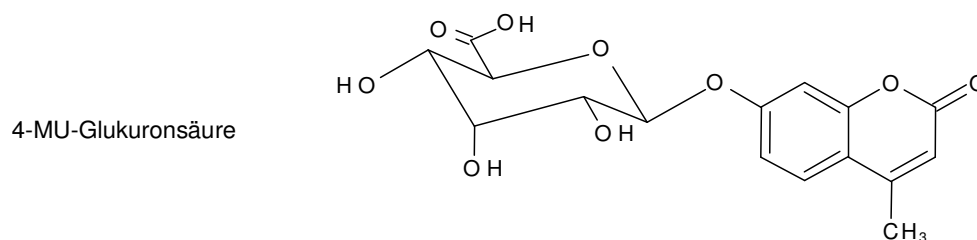


**Abbildung 1-4** Blutgerinnungshemmendes Coumarin-Derivat Phenprocoumon (Marcumar®)

Umbelliferon selbst wird höchstens eine adjuvante Wirkung zugeschrieben. Bemerkenswert ist, dass weder Coumarin noch Umbelliferon eine hemmende Wirkung auf das Hyaluronsäuresystem ausüben (Morohashi et al. 2006).

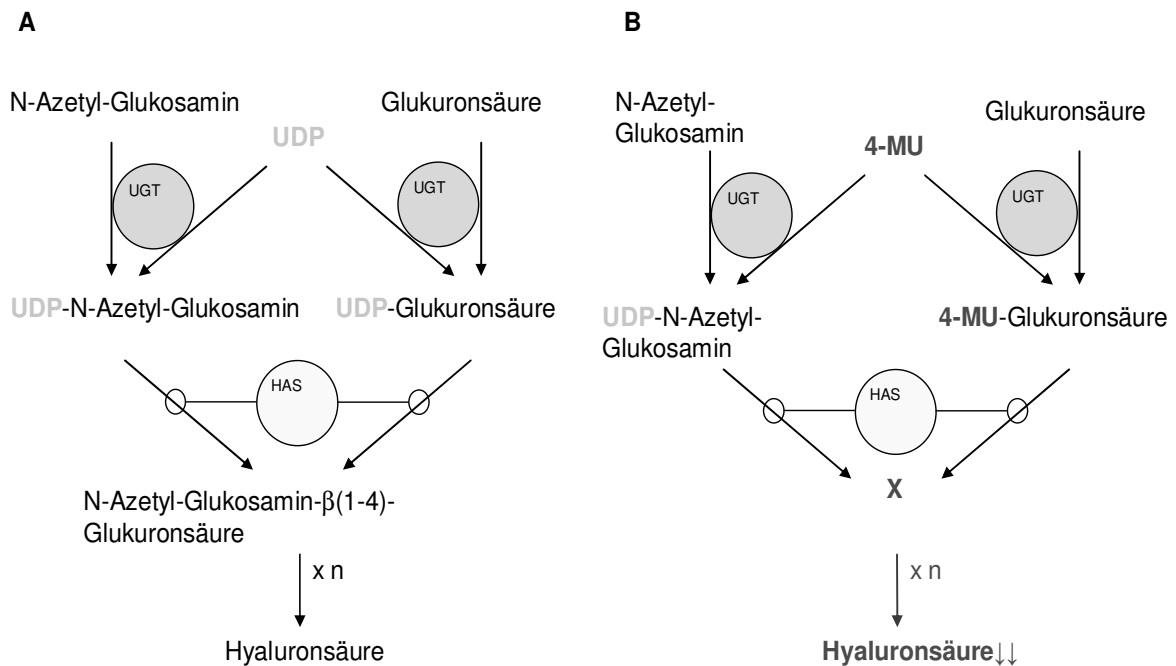
### 1.3.2 Wirkungsmechanismus

4-Methylumbelliferon fungiert als 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 (siehe **Abbildung 1-1**). Die Aktivierung von N-Azetylglukosamin und Glukuronsäure zu UDP-N-Azetylglukosamin und UDP-Glukuronsäure findet über eine UDP-Glukuryltransferase (UGT) statt. 4-Methylumbelliferon wird von dieser UDP-Glukuryltransferase statt Uridindiphosphat (UDP) mit Glukuronsäure zu 4-MU-Glukuronsäure verknüpft.



**Abbildung 1-5** 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.

Durch diesen Prozess verarmt die Zelle an aktivierter UDP-Glukuronsäure, was in der Folge zu einer verminderten Hyaluronsäureproduktion führt (Kakizaki et al. 2004).



**Abbildung 1-6** Mechanismus der Hyaluronsäuresynthese (A) und dessen Hemmung durch 4-Methylumbelliferon (B).

Die UDP-Glukuryltransferase (UGT) addiert ein aktivierendes Uridindiphosphat (UDP) an N-Azetyl-Glukosamin und Glukuronsäure. Diese werden im Anschluss daran von der Hyaluronsäuresynthase (HAS) zu Hyaluronsäure verknüpft. 4-MU wird anstelle von UDP mit Glukuronsäure verknüpft; Es resultiert eine Hemmung der Hyaluronsäuresynthese (Twarock, 2008)

Des Weiteren hemmen hohe Konzentrationen an D-Mannose über den gleichen Mechanismus, wenn auch weniger selektiv, die Bildung von UDP-N-Azetylglukosamin und darüber die Hyaluronsäuresynthese. Die Hyaluronsäuresynthasen 1-3 scheinen dabei nicht herunterreguliert zu werden (Jokela et al. 2008).

### **1.3.3 Geschichte des 4-Methyl-Umbelliferon als Hyaluronsäureinhibitor und seine Anwendung in der Karzinogeneseforschung**

Im Jahr 1995 wurde erstmals von Nakamura et al. ein Effekt von 4-MU auf die Hyaluronsäuresynthese von humanen Hautfibroblasten gezeigt (Nakamura et al. 1995). Sie konnten bereits zeigen, dass der Einsatz von 4-MU den hochmolekularen Anteil an in das Medium abgegebener Hyaluronsäure stärker verringert als den Anteil mittlerer Größe. Zudem stellten sie fest, dass 4-MU keinen Einfluss auf die Galactosaminoglykane Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat hat (Nakamura et al. 1995). Zudem wurde in dieser Arbeit bereits eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, die ein Maximum bei 0.5 mM aufweist. 1997 konnte dieselbe Arbeitsgruppe zeigen, dass 4-MU die Hyaluronsäure direkt am Enzym inhibiert und dafür keine weiteren Zellkompartimente in Anspruch genommen werden müssen (Nakamura et al. 1997). 2002 zeigten Kakizaki et al. anhand der Hyaluronsäuresynthese von *Streptococcus equi*, dass sich in Bezug auf das Hyaluronsäuresynthase-Enzym weder mRNA, noch Proteinlevel nach Einsatz von 4-MU änderten (Kakizaki et al. 2002). Ebenfalls 2002 wurde von Nakamura *et al.* (Nakamura et al. 2002) eine Induktion der Genexpression von MMP-1 und der Aktivität von MMP-2 durch 4-MU gezeigt (Nakamura et al. 2002). Diese sind wahrscheinlich als eine Folge der Matrixveränderungen unter Hyaluronsäuredepletion zu erklären.

Seit der Entdeckung des Wirkungsmechanismus durch Kakizaki *et al.* (Kakizaki et al. 2004) im Jahre 2004 rückt 4-MU immer mehr in Augenschein auf dem Feld der Extrazellulärmatrixforschung und erhält wachsende internationale Aufmerksamkeit.

In der genannten Veröffentlichung von 2004 wird UDP-Glukuronsäure (siehe 1.3.2), als die Zielstruktur für die Wirkung von 4-MU nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass unter Zugabe von UDP-Glukuronsäure der Effekt von 4-MU auf die Hyaluronsäuresynthese vollständig reversibel ist, was auf eine kompetitive Substrathemmung durch 4-MU hinweist. In der Folgezeit wurde 4-MU von verschiedenen Arbeitsgruppen in Zellkulturversuchen eingesetzt und untersucht. 2004 konnte gezeigt werden, dass 4-MU die Adhäsion von Tumorzellen untereinander und ihre Bewegung senkt (Kudo et al. 2004). Ebenfalls 2004 konnte eine Arbeitsgruppe über den Einsatz von 4-Methylumbelliferon zur Eindämmung

einer Keratinozytenaktivierung und einer epidermalen Hyperproliferation berichten (Rilla et al. 2004).

Die erste Veröffentlichung zu in vivo Versuchen mit 4-Methylumbelliferon ist 2005 von Yoshihara et al. erschienen. Diese stellten eine Akkumulation von 4-Methylumbelliferon in der Leber von Nacktmäusen fest und untersuchten daraufhin den Einfluss dessen auf Lebermetastasen. In einer mit 4-Methylumbelliferon behandelten Versuchsgruppe zeigten sie eine Reduktion von Lebermetastasen um 30 %. Wurden die Tumorzellen zusätzlich mit 4-Methylumbelliferon vorbehandelt, so kam es sogar zu einer Reduktion der Lebermetastasen um 50% (Yoshihara et al. 2005). Setzt man 4-Methylumbelliferon als Chemotherapie-Adjuvans ein, so scheint dieses zu einem erhöhten Ansprechen von humanen Pankreaskarzinomzellen auf die Behandlung zu führen (Nakazawa et al. 2006). Es wird vermutet, dass in diesem Zusammenhang wahrscheinlich die unter **1.2.3** beschriebenen Mechanismen der Auflösung des Hyaluronsäuremantels und der Verminderung des CD44 vermittelten PI3K-AKT Signalweges zum Tragen kommen, wie sie bereits früher unter einer Hyaluronidase-Behandlung genutzt wurden (Baumgartner et al. 1998; Baumgartner et al. 1998).

2006 untersuchten Morohashi *et al.* die Wirkung von strukturellen Varianten des 4-MU-Gerüsts auf humane Pankreaskarzinomzellen und fanden zwei Derivate mit einer geringfügig erhöhten Wirkung auf die Hyaluronsäureproduktion. Diese unterscheiden sich von 4-Methylumbelliferon durch eine zusätzliche Hydroxy-Gruppe in Position 5 oder 6. 6-Hydroxy-4-Methylumbelliferon wird auch 4-Methyl-esculetin (=4-ME) genannt (Morohashi et al. 2006). Des Weiteren konnte 2006 gezeigt werden, dass 4-MU die HAS3-vermittelte Proliferation und Invasion von Osteosarkom-Zellen hemmt (Tofuku et al. 2006). 2007 wurde der Einfluss von 4-ME auf das Tumorwachstum in immundefizienten Nacktmäusen gezeigt. Die Autoren konnten eine starke Senkung der Tumorpheriferation nachweisen (Hajime et al. 2007). Zudem erschien 2007 eine Studie, in der eine Abnahme der MMP-9-Expression in Krebszellen unter 4-MU Behandlung beschrieben wird (Nakamura et al. 2007). Im Jahr 2009 konnten Kultti et al. zeigen, dass 4-MU die Hyaluronsäureproduktion über einen Abbau von UDP-Glukuronsäure und eine Abregulation der Hyaluronsäuresynthasen 2 und 3 erniedrigt (Kultti et al. 2009). Anfang 2010 zeigte eine Veröffentlichung, dass 4-MU das Tumorzellwachstum von humanen Melanomzellen hemmt (Edward et al. 2010).



### **1.3.4 Wirksamkeit und Sicherheit**

4-Methylumbelliferon ist seit 1982 in Deutschland mit der INN Bezeichnung Hymecromon unter den Handelsnamen Cholspamin® forte und Chol-Spasmoletten® der Firma Dolorgiet GmbH & co. KG zur symptomatischen Behandlung von Gallenwegscholiken zugelassen. Die Wirksamkeit gegen Spasmen der Gallenwege beruht auf einer Ausnutzung der papaverinartigen Wirkung von 4-MU. Die übliche Tagesdosis beträgt bei dieser Anwendung 1200 mg (3x400mg) oral pro Tag. Selbst für hohe Dosierungen sind keine schwerwiegenden Nebenwirkungen bekannt.

Dies spricht für eine gute Verträglichkeit der hier untersuchten Substanz, die durch ihren Status als zugelassenes Arzneimittel bereits sämtliche zulassungsrelevanten Hürden, wie toxikologische Prüfungen und Unbedenklichkeitsuntersuchungen, passiert hat (Dolorgiet 1982, 2002, 2008). Einer klinischen Erprobung am Menschen im Sinne eines Tumortherapeutikums scheint somit der Weg geebnet.

Die vorliegende Arbeit soll in diesem Zusammenhang der Grundlagenforschung im Bereich der pharmakologischen Hyaluronsäurereduktion dienen, damit eine künftige Pharmakotherapie vor dem Hintergrund eines aufgeklärten Wirkungsmechanismus ablaufen könnte.

## 1.4 Zielsetzung

Die Umgebung von Tumorzellen weist häufig eine Anreicherung der extrazellulären Matrix mit Hyaluronsäure auf, die für eine Vielzahl von Malignität-bestimmenden Faktoren wie Metastasierung, Invasion und Chemotherapieresistenz verantwortlich ist (Toole 2002; Twarock et al. 2009; Twarock et al. 2010). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem konstitutiv aktiven Hyaluronsäuresystem der Ösophaguskarzinomzelllinie OSC1 und dessen pharmakologischer Beeinflussbarkeit in einem *in vivo* Versuch an NMRI nu/nu Nacktmäusen. Stellvertretend für andere Tumorarten werden die Auswirkungen des Hyaluronsäureinhibitors 4-Methylumbelliferon (4-MU) und einer genetischen Hemmung der Hyaluronsäuresynthase 3 (HAS3) erforscht.

Dabei steht die Frage im Vordergrund, ob es durch eine pharmakologische Therapie gelingt, das Hyaluronsäuresystem des Tumors dergestalt zu beeinflussen, dass eine Ausbreitung des Tumors *in vivo* verhindert oder aufgehalten werden kann. Eine ösophageale Tumorzelllinie 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 (Baumhoer and Ramadori 2005). Zudem sind in unserer Arbeitsgruppe bereits Ergebnisse auf diesem Gebiet der onkologischen Hyaluronsäureforschung an dieser Tumorzelllinie *in vitro* erzielt worden, welche durch einen *in vivo* Versuch weitergehend untersucht werden sollten.

Folgende Parameter einer Behandlung von OSC1-Tumorgewebe mit 4-MU bzw. einer genetischen Hemmung der HAS3 Genexpression sollen untersucht werden:

1. Welchen Einfluss hat eine Inhibition der Hyaluronsäuresynthese auf die Morphologie der Tumoren?
2. Welche Mechanismen liegen diesen morphologischen Veränderungen zugrunde?
3. Welche funktionellen Auswirkungen haben diese Veränderungen auf das OSC1-Tumorzellgewebe?
4. Sind die durch 4-MU erzielten Ergebnisse durch eine spezifische Hemmung der Hyaluronsäuresynthase-3 reproduzierbar?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Substanzen

*Tabelle 2-1 Verwendete Substanzen und Komplettpakete*

<b>Substanzen</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Aceton</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Aqua dest.</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Blaugel</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Eosin</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Entellan</b>	Merck, Darmstadt
<b>Ethanol absolut</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Formaldehyd</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Hämalaun</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Hoechst 33324</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>HCl (Salzsäure)</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Isopentan</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Methanol</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Nagellack (handelsüblich)</b>	Beiersdorf, Hamurg
<b>Streptomyces Hyaluronidase</b>	MP Biomedicals, Frankreich
<b>Tissue Tek</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Vectashield® Antifade Mounting Medium</b>	Vector Laboratories, CA, USA
<b>Xylol</b>	Sigma-Aldrich, München

## 2.2 Puffer und Lösungen

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

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
Aceton- Methanol	2:3
Blockierungs-Puffer	1x PBS 1 % (w/v) BSA (Bovines Serumalbumin) 10% FCS
Bovines Serumalbumin	1% BSA in 1x Phosphat-buffered-saline
1xPhosphat-buffered-saline (PBS)	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
Negativ Kontrolle für Immunhistochemische Färbungen	1%BSA 1xPBS
Isopentan	2 Methylbutan, Lagerung bei -80°C

## 2.3 Antikörper

**Tabelle 2-3** In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper

Primär-Antikörper	Hersteller	Verdünnung (in 1% BSA in 1x PBS)
Guinea pig anti-cytokeratin 18	Progen, Heidelberg	1:200
Rabbit anti-Ki67	Abcam, Cambridge, UK	1:50
Rabbit anti-CD44H	Sigma-Aldrich, München	1:1000
Rabbit anti-alpha-smooth-muscle-actin	Abcam, Cambridge, UK	1:50
Rabbit anti-RHAMM polyklonaler Antikörper	Savani Lab	25 µg / ml
Rat anti-CD31	Abcam, Cambridge, UK	1:50
Hyaluronsäurebindeprotein, biotinyliert	Seikagaku, Tokyo, Japan	6 µg / ml
Hoechst 33342	VWR, Darmstadt	1:20000

**Tabelle 2-4** In der Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper

Sekundär-Antikörper	Hersteller	Verdünnung (jeweils in 1xPBS)
Goat anti-guinea pig FITC-konjugiert	Dianova, Hamburg	1:200
Sheep anti-rabbit IgG F(ab') <sub>2</sub> Frag. CY3-konjugiert	Sigma-Aldrich, München	1:50
Sheep anti-rabbit IgG F(ab') <sub>2</sub> Frag. CY3-konjugiert	Sigma-Aldrich, München	1:500
Sheep anti-rabbit IgG F(ab') <sub>2</sub> Frag. CY3-konjugiert	Sigma-Aldrich, München	1:200
Goat anti-rat RhodX-konjugiert	Dianova, Hamburg	1:200
Streptavidin, Cy3-konjugiert	Caltag Lab., Hamburg	1:200

## 2.4 Geräte und Verbrauchsmaterial

**Tabelle 2-5** Verwendete Geräte und Material

Geräte-Typ	Geräte-Bezeichnung	Hersteller
Fluoreszenz-Mikroskop inkl. Kamera und Software	Olympus BX 50 Colorview II Kamera mit Soft Imaging System-Software	Olympus, Hamburg Soft Imaging System, Münster
Kryostat	Leica CM1850	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Kryostatmedium	Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V.
LabTek Chambers		Sigma-Aldrich, München
Objekträger		Sigma-Aldrich, München
Objekträgerkästen für Gefrierschnitte		Sigma-Aldrich, München
Pipetten & Pipettenspitzen		Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R (kühlbar)	Eppendorf, Hamburg

## 2.5 NMRI nu/nu Mäuse

Homozygote NMRI nu/nu Mäuse werden in der experimentellen Medizin seit 1969 (Rygaard and Povlsen 1969) für Forschungen an Heterotransplantaten von humanen Tumoren genutzt.

Diese zeichnen sich durch eine T-Zell-Armut aus, welche zu nicht durch das Immunsystem der Maus beeinflussten Ergebnissen führt. Aufgrund der T-Zell-Armut ist es möglich, Tumore von artfremden Organismen (wie z.B. dem Mensch) auf diese Mausart zu transplantieren. Seit 1969 haben einige Arbeiten den Nutzen der Mausart in der Tumorforschung bestätigt (Fogh et al. 1977; Sarbia et al. 1997).

Bei diesem Mausstamm ist es aufgrund von Veränderungen in der Entwicklung des ektodermalen Kompartimentes in der Embryonalentwicklung zu einer Aplasie des Thymus und des Fells gekommen.

Die Mäuse lassen sich wie folgt charakterisieren:

- Wenige T-Zellen
- Die immunologische Antigen-Antwort beschränkt sich auf Immunglobuline der Klasse IgM
- Die Immunantwort auf T-Zell-abhängige Antigene ist gering
- Es kommt zu einem kompensatorischen leichten Anstieg von Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) im Gegensatz zu normalen NMRI-Mäusen

## 2.6 Futtermittel

*Tabelle 2-6* Verwendetes Futter für Nacktmäuse

Name	Zusammensetzung	Hersteller
V 1244-000	Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"><li>• Rohprotein 26,10 %</li><li>• Rohfett 5,80 %</li><li>• Rohfaser 3,70 %</li><li>• Rohasche 7,00 %</li><li>• Calcium 1,00 %</li><li>• Phosphat 0,70 %</li><li>• Natrium 0,30 %</li></ul>	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

	Zusatzstoffe: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vitamin A           25000 IE/kg</li> <li>• Vitamin D3         1000 IE/kg</li> <li>• Vitamin E           125 mg/kg</li> <li>• Vitamin C</li> <li>• Kupfer,             Kupfer-(II)-sulfat Pentahydrat         5 mg/kg</li> </ul>	
4-Methyl-Umbelliferon	4-Methyl-Umbelliferon	Sigma-Aldrich, München

## 2.7 OSC-1 Zellen

Die humane Ösophaguskarzinomzelllinie OSC-1 wurde von Sarbia et al. isoliert und erstmals beschrieben (Sarbia et al. 1997). OSC-1 Zellen sind Plattenepithelkarzinomzellen und wurden aus Resektaten von europäischen Ösophaguskarzinompatienten nach Ösophagektomie isoliert.

Diese Zelllinie wächst unter *in vitro* Bedingungen in einer kopfsteinpflasterartigen, epithelialen Anordnung. Zuerst entstehen isolierte epitheliale Zellnester, welche im Laufe der Zeit miteinander in Verbindung treten.

In einem *in vivo* Versuch an Nacktmäusen stellten Sarbia et al. fest, dass sich nach 2 Monaten Wachstum Tumore mit einem Durchmesser von ca. 4 mm an der Injektionsstelle entwickelt hatten. Die durch OSC-1 gebildeten Sphäroide zeigten bei einem mittleren Durchmesser über 1 mm einen zentral nekrotischen Bereich, welcher von einer Wachstumszone umgeben war.

Metastasen ließen sich in ihren Versuchen sowohl makro- als auch mikroskopisch nicht nachweisen.

Das Tumorgewebe stellte sich *in vivo* als niedrig differenziertes, solides Karzinom mit einem aggressiven Wachstumsverhalten dar.

## 2.8 Tierversuch/ Aufbau

Die Tierexperimente wurden in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt und vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, NRW, genehmigt.

### 2.8.1 4-MU Versuch

Pro Injektionsstelle wurden  $10^6$  Zellen aus der Zelllinie OSC1 beidseitig subkutan in die Flanken von 14 NMRI nu/nu Mäusen injiziert.

Die Versuchsgruppe (8 NMRI nu/nu Mäuse) wurde über 47 Tage mit 4-MU versetztem V1244-000 Futter (250mg/day) gefüttert, wohingegen die Kontrollgruppe (6 NMRI nu/nu Mäusen) mit reinem V1244-000 Futter (siehe **Tabelle 2-6**) gefüttert wurde.

Während dieser Zeitspanne wurden die Tiere in regelmäßigen Abständen von 3-4 Tagen auf das Anwachsen der Tumorzellen hin untersucht.

### 2.8.2 Lentiviraler Knockdown von HAS-3

Pro Injektionsstelle wurden  $10^6$  Zellen aus der Zelllinie OSC1 beidseitig subkutan in die Flanken von 7 NMRI nu/nu Mäusen in der Kontrollgruppe, sowie 7 shHAS3 - Mäusen in der Versuchsgruppe injiziert (siehe **Abschnitt 2.16**).

Sowohl Versuchs- als auch Kontrollgruppe wurden über 67 Tage mit reinem V1244-000 Futter (siehe **Tabelle 2-6**) gefüttert.

Während dieser Zeitspanne wurden die Tiere in regelmäßigen Abständen von 3-4 Tagen auf das Anwachsen der Tumorzellen hin untersucht.



## **2.9 Gewebeentnahme und Gewebeaufarbeitung**

Die Tumorgroße wurde fortlaufend mit einer Schieblehre und am Versuchsende mittels Flächendetektor-Volumen-Computertomographie (fpVCT; GE Global Research, Niskayuna, NY) von Prof. Dr. med. Frauke Alves (Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinik Göttingen) *in vivo* bestimmt. Diese Art der nicht-invasiven Bildgebung von Tumoren wurde 2008 von Missbach-Guentner et al. beschrieben (Missbach-Guentner et al. 2008). Hierbei wurde ein iodhaltiges Kontrastmittel (Isovist 300®) intravenös appliziert. Anschließend wurde das Tumorgewebe entnommen und für die immunhistochemischen Färbungen in mit TissueTek gefüllten LabTek-Chambers positioniert und in Isopentan bei -40°C eingefroren. Die Endlagerung erfolgte in einem Gefrierschrank bei -80°C.

## **2.10 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Zur Vorbereitung des Schneidens wurden die Gewebeblöcke am Vortag von -80°C auf -20°C erwärmt. Anschließend wurde der jeweilige Gewebekblock mit TissueTek auf einen gekühlten Kryostatenstempel aufgebracht und in dem Schneideblock des Kryostaten befestigt.

Von den Geweben wurden 8µm dicke Gefrierschnitte bei -30°C angefertigt und jeweils als 2 Konsekutivschnitte auf gekühlte Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden bei -20°C in speziellen, mit Leukosilk abgedichteten, Aufbewahrungskästen für Gefrierschnitte aufbewahrt. In jedem befand sich zudem ein Teebeutel mit ausgeglühtem Blaugel, von dem eventuell entstehende Feuchtigkeit aufgenommen werden sollte.

## **2.11 Hämalaun-Eosin-Färbung**

Zunächst wurden die Gefrierschnitte für 30 min in kühlschranktemperiertem 10%-igem Formalin, was 4% Formaldehyd in wässriger Lösung entspricht, fixiert. Darauf folgte ein fünfminütiger Waschschrift in 1xPBS (phosphat-buffered-saline).

Die eigentliche Färbung erfolgte in folgenden Schritten:

Zuerst wurden die Objektträger für eine Minute sowohl in Aqua dest. als auch in Hämalaun getaucht, gefolgt von kurzem Eintauchen in Leitungswasser, 1%iger HCl-Lösung und anschließendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten. Als letzter Schritt der eigentlichen Färbung wurden die Objektträger für eine Minute mit 1%igem Eosin bedeckt.

Daran schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, Ethanol absolut) und ein zweiminütiges Tauchbad in Xylol an. Eingedeckt wurden die Objektträger schließlich unter einem Abzug mit Entellan.

## **2.12 Immunhistochemische Färbungen**

### **2.12.1 Zytokeratin 18, Alpha-smooth-muscle-Actin, CD31**

Für die folgenden Färbungen wurden die Gefrierschnitte in einer Aceton: Methanol Lösung (2:3, 4°C) fixiert und anschließend für eine Stunde in Blockierlösung (aus 1x PBS, 1 % (w/v) BSA, 10% FCS) blockiert:

- Humanes Zytokeratin 18 (Progen, 1:200),
- CD31 (Abcam, 1:50),
- alpha-smooth-muscle-Actin (Abcam 1:50).

Alle primären Antikörper wurden jeweils in 1%BSA in 1xPBS gelöst und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Zweitantikörper wurden für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss goat anti-guinea-pig-FITC (Dianova, 1:200), goat anti-rat-RhodX (Dianova, 1:200) und sheep anti-rabbit IgG F(ab')<sub>2</sub>-CY3 (Sigma-Aldrich, 1:200) eingesetzt. Alle sekundären Antikörper wurden in 1x PBS gelöst. Gewaschen wurde jeweils nach Fixierung, Erstantikörper, Zweitantikörper und Kernfärbung für 3x 5 min in 1xPBS.

Abschließend wurden in allen Färbungen die Kerne mit Hoechst 33342 (1:20000 in 1xPBS) für zwei Minuten gefärbt, das Präparat mit *Vectashield Antifade Mounting Medium*<sup>®</sup> (Vector Laboratories, CA, USA) eingedeckt und mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

### **2.12.2 Hyaluronsäurefärbung**

Zuerst wurden die Gefrierschnitte 25 min in Aceton-Methanol Lösung (2:3, 4°C) fixiert und anschließend für eine Stunde in Blockierlösung (aus 1x PBS, 1 % (w/v) BSA, 10% FCS) blockiert.

Hyaluronsäure wurde immunhistochemisch mit Hilfe eines biotinylierten Hyaluronsäurebindungsproteins (HAbP, Seikagaku, 6µg/ml) und Streptavidin CY3-konjugiert (Caltag Lab., 1:200) nachgewiesen.

Waschschritte und Kernfärbung waren identisch mit den beschriebenen Färbungen unter 2.12.1.

### **2.12.3 Anti- Ki67, Anti-CD44H**

Alternativ dazu wurden Gefrierschnitte mit Ethanol 96% bei 4°C fixiert und für eine Stunde in Blockierlösung (aus 1xPBS, 1% (w/v) BSA, 10%FCS) blockiert, um sie für Färbungen von

- Ki67 (Abcam, 1:50) und
- Humanem CD44 (Sigma-Aldrich, 1:1000) (beide bei 4°C über Nacht)

vorzubereiten.

Diese Epitope wurden mit Hilfe von sheep anti-rabbit IgG F(ab')<sub>2</sub>-CY3-konjugiert (Sigma-Aldrich, 1:50/ 1:500) sichtbar gemacht.

Waschschritte und Kernfärbung waren identisch mit den beschriebenen Färbungen unter 2.12.1.

### **2.12.4 RHAMM Färbung**

Für die immunhistochemische Färbung des Hyaluronsäurerezeptors RHAMM wurden die Gefrierschnitte im ersten Schritt in 10% Formalin fixiert und anschließend wurde für 30 min die endogene Fluoreszenz durch eine Lösung aus 0,01g NaBH<sub>4</sub>/10 ml 1x PBS blockiert. Nach einem Waschblock von 3 x 5 min in 1x PBS folgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungen mittels einer Blockierlösung aus 1x PBS, 1% (w/v) BSA und 10% FCS. Der primäre rabbit-anti-RHAMM Antikörper wurde in 1% BSA in 1x PBS gelöst und bei 4°C über Nacht auf die Gefrierschnitte aufgetragen. Als sekundärer Antikörper wurde für 2,5 Stunden am nächsten Tag *sheep anti-rabbit IgG* F(ab')<sub>2</sub>-CY3 (Sigma-Aldrich, 1:200) in 1x PBS gelöst eingesetzt. Waschschritte und Kernfärbung waren identisch mit den Färbungen unter 2.12.1.

## 2.13 Auswertung der Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Hämalaun-Eosin (H.E.) gefärbten Präparate wurden mit einem Olympus BX 50 Mikroskop mit einer nicht gekühlten Colorview II Kamera mit Soft-Imaging System-Software aufgenommen und in 40-facher, 100-facher, 200-facher Vergrößerung fotografiert. Dabei waren die Belichtungszeiten innerhalb jeder Vergrößerungsreihe identisch und somit untereinander vergleichbar. Die H.E.-Färbung diente dem Vergleich von möglichen morphologischen Unterschieden zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe.

## 2.14 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Präparate wurden im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Eine mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Olympus BX 50 Fluoreszenzmikroskop mit einer nicht gekühlten Colorview II Kamera mit Soft-Imaging System-Software. Zusammengehörige Präparate wurden stets mit der gleichen, für die jeweilige Färbung benötigte, Belichtungszeit aufgenommen (Belichtungszeiten siehe Bildbeschriftungen). Die verwendeten Chromophore sind in **Tabelle 2-7** aufgeführt.

**Tabelle 2-7** In der Fluoreszenzmikroskopie verwendete Chromophore

Chromophor	Absorptionmaximum	Emissionsmaximum	verw. Exzitation
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
Rhodamin X	570 nm	590 nm	

Eine Nachbearbeitung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte auf elektronischem Wege mit Photoshop CS (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

Dabei wurden die einzelnen, in RGB-Farben vorliegenden Fluoreszenzkanalbilder im TIF-Dateiformat gespeichert und mittels Photoshop CS durch eine negative Multiplikation der Ebenen übereinandergelagert. Die Ebenen wurden dann gemeinsam im verlustfreien TIF-Format abgespeichert und das so entstandene Bild mittels Image J und Graph Pad (siehe Abschnitte **2.14.1** und **2.14.2**) ausgewertet.

## 2.14.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Hyaluronsäure und CD31

Im ersten Schritt wurde die im RGB-Farbraum vorliegende, im TIF-Format gespeicherte Bilddatei des auszuwertenden fluoreszierenden Kanals (z.B. Cy3, FITC) in Image J geöffnet und in einen 8-Bit Farbkanal transferiert.

Danach wurde ein vorher für die jeweilige Fluoreszenz festgelegter Schwellenwert bestimmt, bis zu welchem das fluoreszierende Signal ausgewertet werden sollte.

Im nächsten Schritt wurde dieses mittels der Funktion „*Analyze Particles*“ ausgewertet. Image J erstellte als Ergebnis eine Auflistung von festgelegtem Schwellenwert, der Anzahl von gezählten Signalen, der *Gesamtfläche in Pixel<sup>2</sup>*, der Durchschnittsgröße der ausgewerteten Signale sowie des *Anteils der ausgewerteten Signale am Gesamtarbeitsbereich des Bildes in % (Area fraction)*.

Diese Ergebnisse wurden in eine eigens erstellte Auswertungsmaske in Microsoft Excel überführt. Mit Hilfe dieser wurde aus den einzelnen für jedes Signal von Image J gelieferten Ergebnissen, die *relative durchschnittliche Intensität* eines jeden ausgewerteten Bildes berechnet. Die einzelnen für jedes Signal ermittelten Flächen wurden miteinander zu einer *Gesamtsumme aller Flächen* addiert.

Zusätzlich wurde jeweils der von Image J angezeigte Durchschnitt eines Signals mit der ermittelten Fläche dieses Signals multipliziert und ergab damit die jeweilige Intensität des einzelnen Signals. Diese einzelnen Intensitäten wurden miteinander zu einer *Gesamtsumme der Intensität* addiert.

Die relative Durchschnittsintensität wurde daraus nach der Formel: *Durchschnittsintensität = Gesamtsumme Intensität / Gesamtsumme Fläche* berechnet.

Die weiteren Berechnungen sind in **Tabelle 2-8** und **Tabelle 2-9** zusammengefasst:

**Tabelle 2-8**

<b>Gesamtfläche (Pixel<sup>2</sup>)</b>	<b>Flächenanteil (area fraction) (%)</b>	<b>Durchschnittsintensität</b>
Durch Image J Auswertung ermittelt	Durch Image J Auswertung ermittelt	= Gesamtsumme Intensitäten / Gesamtsumme Fläche

**Tabelle 2-9**

<b>Normierung</b>	<b>Relativer Flächenanteil (rel.)</b>	<b>Relative Intensität nach</b>	<b>Mittelwert der rel. Intensität je Tumor</b>

	<b>area fraction)</b>	<b>Normierung</b>	
100 / Schwellenwert x Durchschnitts- intensität	Relativer Flächenanteil / 100	Normierung x Relativer Flächenanteil	Mittelwert der relativen Intensitäten nach Normierung je Tumor (n=x Bilder)

Die auf diesem Wege ermittelten Mittelwerte der relativen Intensität jedes Tumors in der entsprechenden Färbung wurden mittels Graphpad statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

### 2.14.2 Auswertung der Färbung des Proliferationsmarkers Ki67

Die ersten Schritte bei der Auswertung der Proliferationsfärbung waren mit den unter 2.14.1 beschriebenen Schritten identisch: Die im RGB-Farbraum vorliegende TIF-Datei wurde in einen 8-Bit Farbkanal transferiert und ein festgelegter Schwellenwert eingestellt. Alle Schritte wurden bei der Auswertung dieser Färbung sowohl mit der Kernfärbung mit Hoechst 33342 als auch der Proliferationsfärbung durchgeführt.

Im nächsten Schritt folgte eine Auszählung der angefärbten Zellkerne mit Hilfe des Zellkernzählers von Image J. Die dadurch erhaltenen Ergebnisse wurden wie folgt mit Hilfe von Microsoft Excel ausgewertet:

**Tabelle 2-10**

<b>Gesamtzahl Zellkerne (ZK)</b>	<b>Anzahl proliferierender Zellkerne</b>	<b>Proliferationsrate in %</b>
Durch Image J ermittelt	Durch Image J ermittelt	Anzahl proliferierender ZK / Gesamtzahl ZK x 100

Im letzten Schritt wurden die einzelnen für jedes Bild eines Tumors ermittelten Proliferationsraten in % zu einem Mittelwert des Tumors zusammengefasst und mittels Graph Pad statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

### 2.15 Statistik

Die ermittelten Ergebnisse wurden mit Hilfe eines „two-tailed Student t test“ statistisch ausgewertet. Statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt. Die Daten werden präsentiert als Durchschnittswert  $\pm$  Standardabweichung.

## 2.16 Lentivirale Ausschaltung der HAS3-mRNA-Expression

Die *in vitro* und *in vivo* Arbeit mit einem lentiviralen System zur Ausschaltung der HAS3-mRNA-Expression wurden im Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf von Dr. rer. nat. Sören Twarock und Dr. rer. nat. Till Freudenberger durchgeführt.

### 2.16.1 Beschreibung des lentiviralen Systems

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

Durch die Interferenz-RNA-Technik wurde für eine effektive Depletion der Zelle an der mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) des Zielgens gesorgt. Die lentivirale Produktion basiert auf einem Drei-Plasmid-System der dritten Generation. Ein Plasmid codierte für das VSV-G (Vesikuläres Stomatitis Virus G-Protein)-Hüllprotein, ein Plasmid trug die aus Sicherheitsgründen verkürzten Stücke der HIV-1 (Humanes Immundefizienzvirus 1) Strukturproteine und das dritte Plasmid enthielt eine gegen HAS3 gerichtete shRNA-Sequenz. Das Ampicillin-Resistenz-Gen (*ampR*) diente der Vervielfältigung des Vektors über eine Selektion in *E. coli*, die Puromycin-Resistenz (*puroR*) zur Selektion der infizierten Zielzellen. Bei der Infektion einer Zielzelle wird nur die Sequenz zwischen den beiden *Long Terminal Repeats* (LTRs) in die DNA (Desoxyribonukleinsäure) des Wirtes integriert. In dieser Sequenz befinden sich keine für den Aufbau der Lentiviren wichtigen Gene. Dadurch kann sichergestellt werden, dass keine vermehrungsfähigen Lentiviren von den Zielzellen produziert werden. Zu guter Letzt sorgt das Verpackungssignal Psi dafür, dass die DNA in die in der Produktionszelllinie entstehenden Lentiviren verpackt wird.

Aus kodierendem Strang und Gegenstrang wird nach Ablesung durch eine DNA-Polymerase die shRNA (*small hairpin RNA*) gebildet, welche letztendlich wie eine herkömmlich siRNA (*small interfering RNA*) über Interferenz-RNA-Mechanismen für eine Zerstörung der Ziel-mRNA sorgt.

Als Kontrolle wurde eine gegen kein bekanntes humanes Gen gerichtete, zufällige shRNA-Sequenz verwendet.

### **2.16.2 Vermehrung der Plasmide**

Unter Ausnutzung des Ampicillin-Resistenz-Gens erfolgte die selektive Amplifikation der Plasmide in E.coli Bakterien (siehe **2.16.1**). Die Aufreinigung der Gesamt-DNA erfolgte durch einen EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen, Hilden. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 260nm mit dem Nanodrop-1000-Photometer (Peglab, Erlangen).

### **2.16.3 Produktion der Lentiviren**

Nach der Vermehrung der Plasmide wurden diese in die Produktionszelllinie HEK 293T (ATCC) mittels des Lipofektions-Reagenzes Fugene 6 (Roche, Mannheim) transferiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und durch Zentrifugation unter Zugabe von Poly-L-Lysin aufkonzentriert. Dies fand unter den von Zhang et al. (Zhang et al. 2001) vorgeschlagenen Bedingungen statt.

### **2.16.4 Infektion der Zielzellen**

Die OSC1-Zielzellen wurden bei einer Multiplicity of Infection (MOI) von 10 infiziert. 10 µg / ml Protaminsulfat wurde zur Verbesserung der Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran zugegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und nach einer Wartezeit von fünf Tagen in normalem Wachstumsmedium wurde die Ausschaltung der Zielgene in den Zellen validiert.

### **2.16.5 Tierversuch**

Pro Injektionsstelle wurden  $10^6$  Zellen aus der infizierte OSC1-Zelllinie beidseitig subkutan in die Flanken von NMRI nu/nu Mäusen injiziert. Genaue Angaben zum weiteren Versuchsaufbau sind Kapitel **2.8.2** zu entnehmen.

Die weiteren Untersuchungen, die an dem entstehenden Tumorgewebe vorgenommen wurden, waren identisch mit den unter **2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14** und **2.15** beschriebenen Vorgängen.

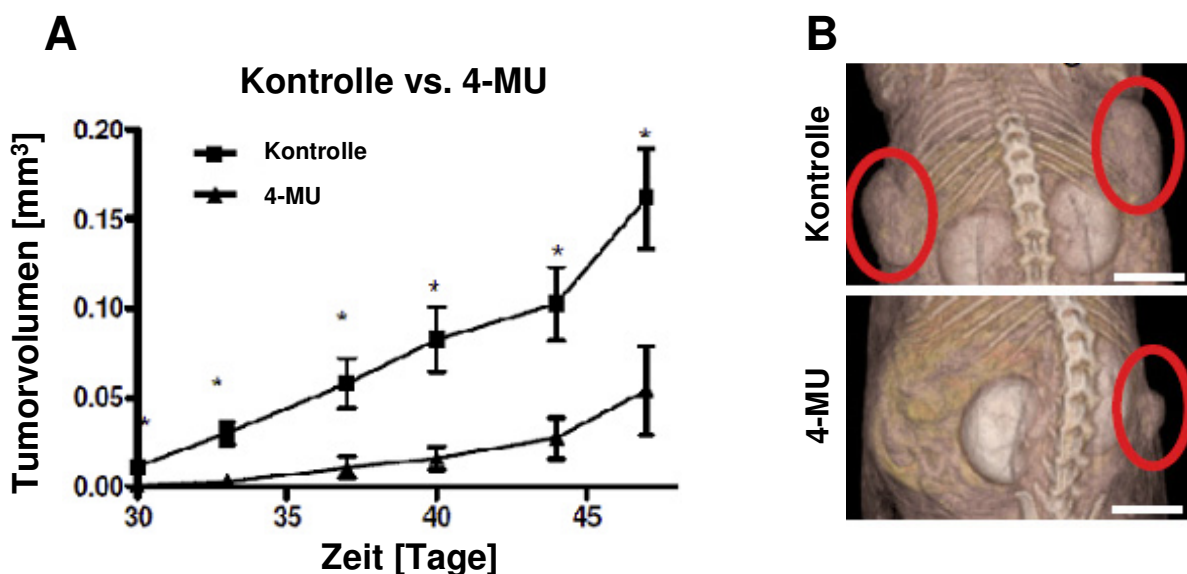


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 4-MU Gruppe

##### 3.1.1 Einfluss von 4-MU auf das Wachstum von OSC1-Tumorgewebe

Das Wachstum des Tumorgewebes von, wie unter 2.8.1 beschrieben, subkutan in die Flanken von NMRI nu/nu Mäusen injizierten OSC1-Zellen wurde während 47 Tagen in regelmäßigen Abständen von wenigen Tagen mit Hilfe einer Schieblehre kontrolliert und gemessen. Hierbei zeigte sich, dass 4-MU zu einer signifikanten Verzögerung der Tumorprogression führte (siehe **Abbildung 3-1 A**).



**Abbildung 3-1** Bestimmung der Tumorgößen im Vergleich von Kontroll- vs. 4-MU Gruppe

(A) mit Hilfe einer Schieblehre in regelmäßigen zeitlichen Abständen nach Injektion der Tumorzellen in die Flanken von NMRI nu/nu Mäusen; Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=21$  (Kontrolle),  $n=17$  (4-MU),  $*p<0,05$ .

(B) mittels Flächendetektor-Volumen- Computertomographie (fpVCT) am Tag der Gewebeentnahme; Maßstabskala 1cm.

In der 4-MU behandelten Versuchsgruppe zeigten sich in A und B signifikant kleinere Tumolvolumina; repräsentative Aufnahmen.

Am Ende der experimentellen *in vivo* Periode zeigte eine zusätzlich angefertigte Flächendetektor-Volumen-Computertomographie (fpVCT) statistisch signifikante kleinere Tumolvolumina in der 4-MU-Gruppe im Vergleich zu der nicht behandelten Kontrollgruppe (Kontrolle  $0,305 \pm 0,063$  cm<sup>3</sup>,  $n=21$  vs. 4-MU  $0,084 \pm 0,036$  cm<sup>3</sup>,  $n=17$ ,  $*p<0,05$ ) (siehe **Abbildung 3-1 B**).

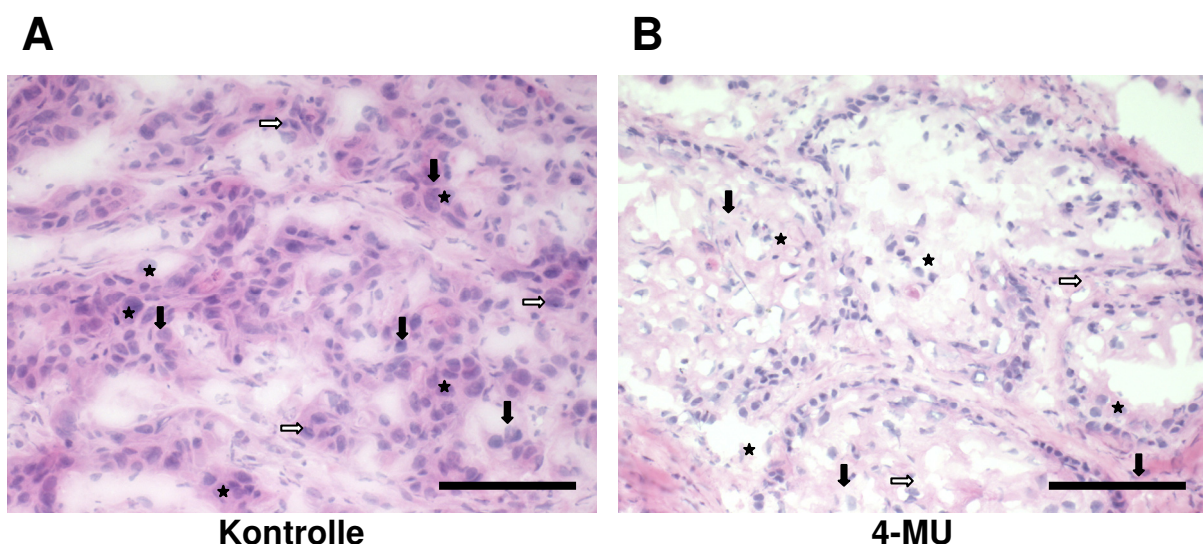
Makrometastasen konnten mit Hilfe der fpVCT sowohl in der Kontroll- als auch in der 4-MU-Gruppe nicht nachgewiesen werden.

### 3.1.2 Einfluss von 4-MU auf die Morphologie von OSC1-Tumorgewebe

Die Behandlung mit 4-MU führte zu histomorphologischen Veränderungen des OSC1-Tumorgewebes.

Das aus OSC1-Zellen entstandene Xenograft-Tumorgewebe stellte sich in der *Hämalaun-Eosin-Färbung* als ein niedrig differenziertes Plattenepithelkarzinom mit einem aggressiven, lokal infiltrierendem und destruierendem Wachstum in den peripheren Randbereichen dar.

Bei der Malignitätsbestimmung mit Hilfe der Hämalaun-Eosin-Färbung zeigten sich als Atypie-Merkmale die Zellpolymorphie, die Anisonukleose, die Zellkernpolymorphie sowie eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns (siehe **Abbildung 3-2**).



**Abbildung 3-2** Atypie-Merkmale des OSC1-Tumorgewebes, H.E.-Färbung, 200-fache Vergrößerung, Maßstabskala 100 µm. Die Sternchen auf den Abbildungen zeigen in Kontroll- und 4-MU behandelter Gruppe repräsentativ auf Anisonukleosen und Zellkernpolymorphie; die schwarzen, senkrechten Pfeile deuten auf die zu Gunsten des Zellkerns verschobene Kern-Plasma-Relation und die weißen, horizontalen Pfeile zeigen exemplarisch auf Zellkernhyperchromasien der Tumorzellen. Repräsentative Aufnahmen.

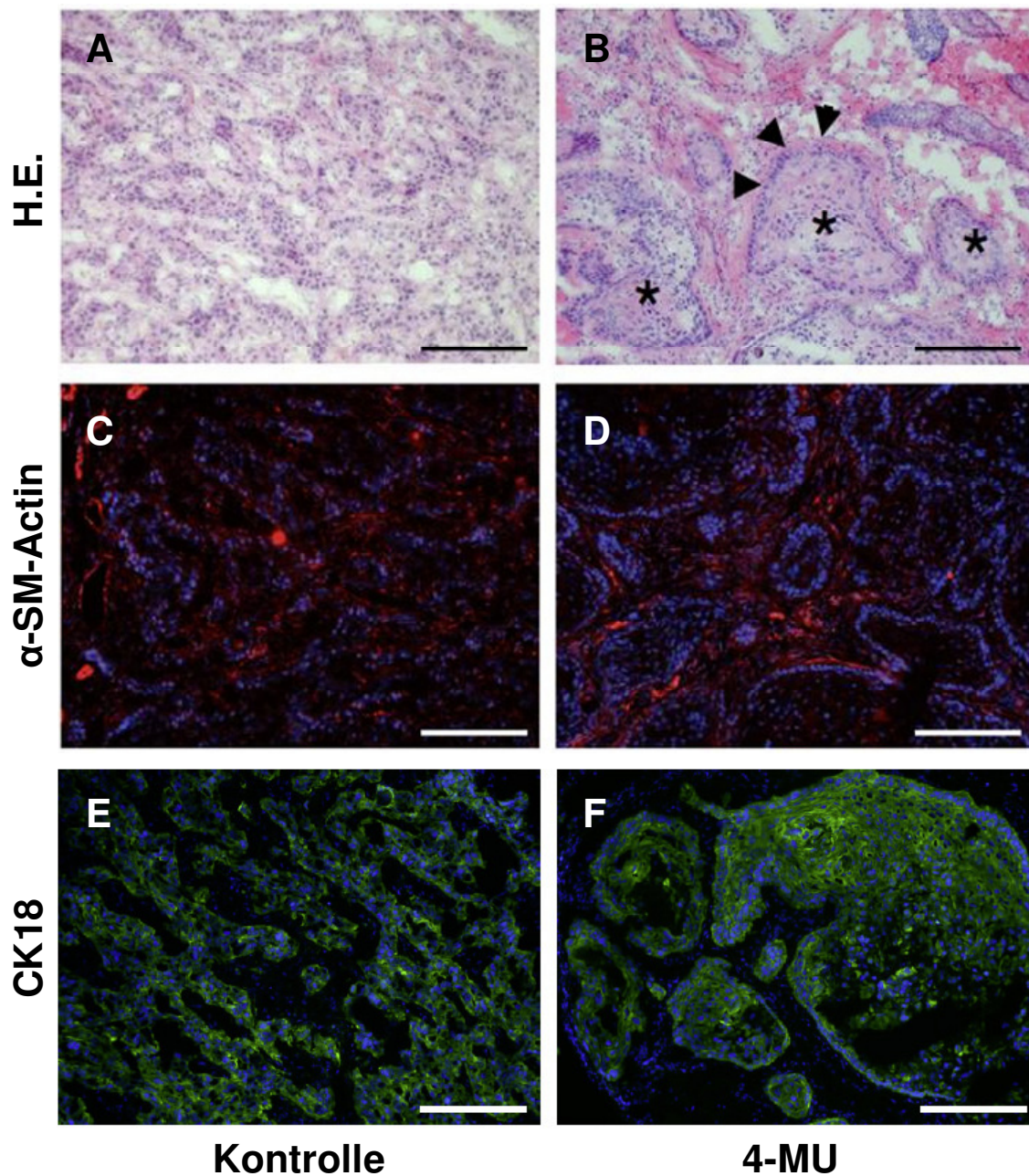
Unter 4-MU-Behandlung stellte sich das Tumorgewebe als höher differenziert und lokal weniger infiltrierend und destruierend als das Kontrolltumorgewebe dar. Die Tumoren waren insgesamt kleiner (siehe **Abbildung 3-1**) und peripher zum Teil von einer zum Teil von bindegewebigen Strängen umgeben (siehe **Abbildung 3-3 B**). Die

Tumorzellen formierten sich unter 4-MU Behandlung zu großen, ausgedehnten Tumorzellnestern, welche von straßenartig angeordnetem, intratumoral gelegenen Stromagewebe umgeben und voneinander separiert wurden (siehe und **Abbildung 3-3 A, B**).

Stroma- sowie Kapselgewebe wurden mittels Färbung des *alpha-smooth-muscle-actin* als fibroblastisch identifiziert (siehe **Abbildung 3-3 C, D**).

Im Zentrum jedes Tumorzellnestes befand sich ein nekrotischer Bereich mit wenigen Zellen (**Abbildung 3-3 B**, Sternchen). Diese nekrotischen Bereiche wurden nach außen von einem zellreichen Randsaum begrenzt (**Abbildung 3-3 B**, Pfeile).

Die spezifische Färbung der OSC1-Tumorzellen wurde durch Nachweis von *humanem Zytokeratin 18* (**Abbildung 3-3 E, F**) erreicht und zeigte, dass 4-MU die Formation von Tumorzellnestern, welche durch stromales Gewebe voneinander separiert sind, forciert.

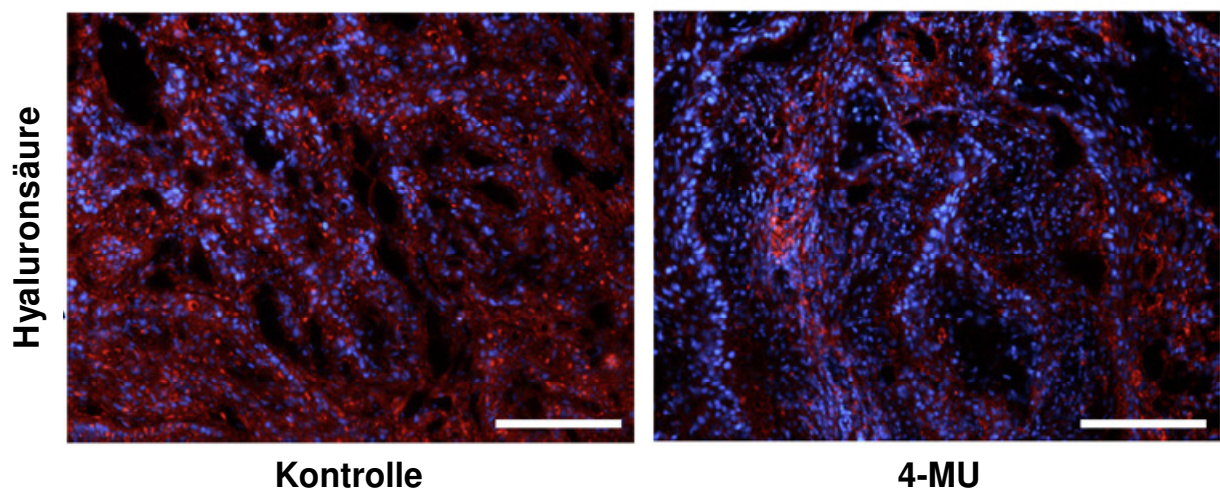


**Abbildung 3-3** Morphologische Veränderungen des OSC1-Tumorgewebes unter 4-MU Behandlung. 100-fache Vergrößerung. Blau in C-F= Zellkerne, Maßstabskalen 200  $\mu$ m  
 (A,B) Hämalaun-Eosin-Färbung; Sternchen: zentral nekrotische Bereiche, Pfeile: zellreicher Randsaum;  
 (C,D) alpha-smooth-muscle-actin Färbung (rot), Belichtungszeiten:  $\alpha$ -SM= 1 s, Kerne= 100 ms;  
 (E,F) Zytokeratin 18-Färbung (grün), Belichtungszeiten: CK 18= 800 ms, Kerne= 50 ms. Repräsentative Aufnahmen.



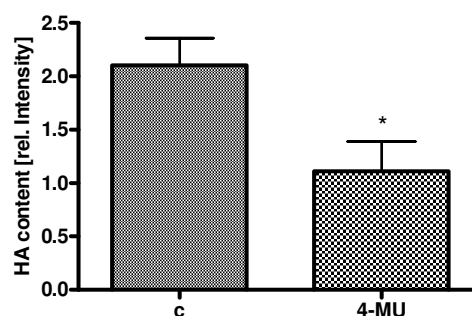
### 3.1.3 Einfluss von 4-MU auf die Verteilung von Hyaluronsäure und den Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM in OSC-1 Tumorgewebe

Die Färbung mit Hyaluronsäure-bindendem-Protein (HAbP) zeigte, dass in den nicht mit 4-MU behandelten Tumorgeweben Hyaluronsäure mit den Tumorzellen, nicht aber mit den intratumoralen stromalen Fibroblasten assoziiert war. Das HAbP-Cy3-Signal war über das gesamte Tumorgewebe gleichmäßig verteilt (siehe **Abbildung 3-4**).



**Abbildung 3-4** Verteilung der Hyaluronsäure (rot) in OSC1-Tumorgewebe in Kontroll- und 4-MU behandelter Versuchsgruppe. HabP- Färbung, 100-fache Vergrößerung; blau= Zellkerne, Belichtungszeiten: HA= 50 ms, Kerne= 100 ms. Maßstabskala 200  $\mu$ m.

In der 4-MU Gruppe kommt es zu einer Abnahme und Umverteilung des HAbP-Signals im Gewebe. Repräsentative Aufnahmen.



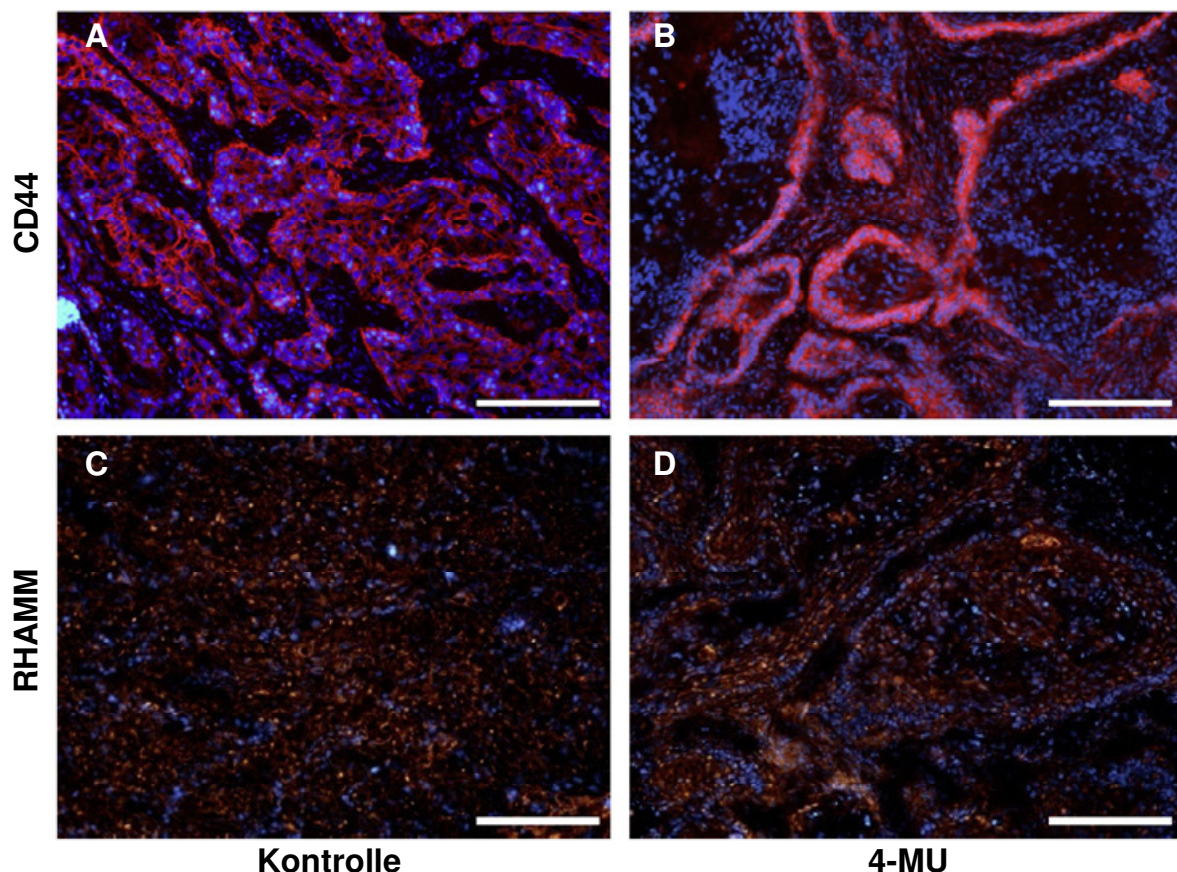
**Abbildung 3-5** Hyaluronsäurequantifizierung. Durch Auswertung der relativen Intensitäten der HAbP-Cy3-Färbung (siehe **Abbildung 3-4**) mittels Image J und Graph Pad ermittelt; \* $p < 0,05$ ,  $n=5-6$ ,  $\pm$  SEM.

Die HA-Konzentration in den 4-MU behandelten OSC1-Tumorgeweben beträgt 52,89 %  $\pm$  10.71% der Konzentration im Kontrollgewebe.

In den 4-MU behandelten Tumorgeweben war das HAbP-Cy3-Signal mit den unter 3.1.2 beschriebenen Tumorzellnestern assoziiert und deutlich inhomogener über das Gewebe verteilt als in den unbehandelten Kontrolltumorgeweben (siehe **Abbildung 3-4**).

Zum anderen ließ sich nach Auswertung mittels Image J und Graph Pad ein in der 4-MU Gruppe signifikant erniedrigter Hyaluronsäuregehalt im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe nachweisen (HA-Gehalt in 4-MU behandeltem Tumorgewebe  $52,89\% \pm 10,71\%$  des HA-Gehaltes im Kontrollgewebe, \*p <0.05, n = 5-6) (siehe **Abbildung 3-5**).

Die oben genannten Phänomene der Umverteilung des HAbP-Cy3-Signals wurden durch die immunhistochemische Färbung der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM weitergehend untersucht.



**Abbildung 3-6** Verteilung der Hyaluronsäurerezeptoren in Kontroll- und 4-MU behandeltem OSC1- Tumorgewebe. 100-fache Vergrößerung, Maßstabskalen 200  $\mu\text{m}$ , blau= Zellkerne. (A,B) Umverteilung von humanem CD44 (rot) an die Randsäume zwischen Tumor- und intratumoralen Stromazellen unter 4-MU Behandlung. Belichtungszeiten CD44= 300 ms, Kerne = 150 ms; (C,D) RHAMM (rot) wurde unter 4-MU Behandlung in OSC1 und Stromazellen detektiert. Belichtungszeiten RHAMM= 40 ms, Kerne= 40 ms. Repräsentative Aufnahmen.

Die Expression von humanem CD44 war in allen Tumorzellen der Kontrolltumorgewebe ausgeprägt und homogen über das gesamte Gewebe verteilt (siehe **Abbildung 3-6 A**). In den mit 4-MU behandelten Tumorgeweben kam es zu einer Umverteilung und Hochregulation des humanen CD44-Rezeptors entlang den unter 3.1.2 beschriebenen, die nekrotischen Areale von dem umgebenden intratumoralen Stromagewebe abgrenzenden, epithelialen Randsäumen der Tumorzellnester (siehe **Abbildung 3-6 B**).

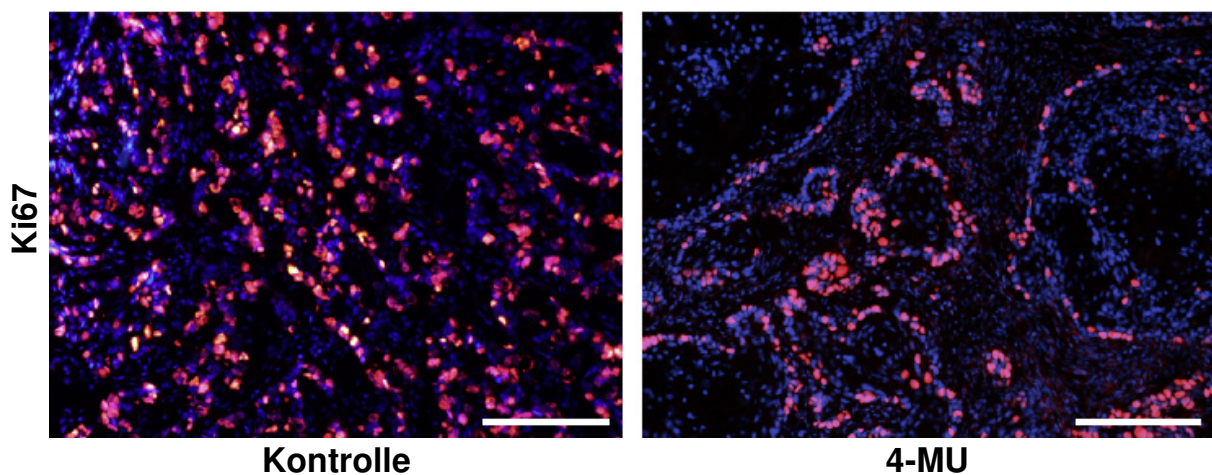
Der Hyaluronsäurerezeptor RHAMM wurde sowohl in Tumor- als auch Stromazellen exprimiert und zeigte keine ausgeprägten Umverteilungsvorgänge nach 4-MU Behandlung (siehe **Abbildung 3-6 C, D**).



### 3.1.4 Inhibitorische Effekte von 4-MU auf die Proliferation von OSC1-Zellen in vivo

Unter 3.1.2 ist durch die immunhistochemische Färbung von humanem Zytokeratin 18 gezeigt worden, dass 4-MU für die Formierung von großen Tumorzellnestern, welche durch stromale Fibroblastenstränge voneinander separiert sind, verantwortlich ist (siehe **Abbildung 3-3**).

Um die zugrunde liegenden Mechanismen der Inhibition von Tumorprogression und Tumolvolumen (siehe **3.1.1**) zu untersuchen, wurde die Proliferation der Tumorzellen immunhistochemisch dargestellt. Hierfür wurden die aus dem Tumorgewebe hergestellten Gefrierschnitte mittels des Proliferationsmarkers Ki67 gefärbt.

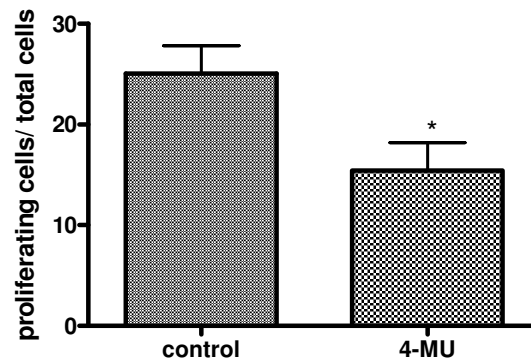


**Abbildung 3-7** Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 (rot) in 4-MU behandeltem und unbehandeltem (Kontrolle) OSC1-Tumorgewebe. Proliferationsrückgang und Umverteilung der proliferierenden Zellen in der 4-MU behandelten Versuchsgruppe. 100-fache Vergrößerung. Blau= Zellkerne, Belichtungszeiten Ki67= 500 ms, Kerne= 150 ms. Maßstabskala 200  $\mu$ m. Repräsentative Aufnahmen.

In der Kontrollgruppe zeigte sich eine Vielzahl von kleinen *Clustern* aus proliferierenden Tumorzellen, welche homogen über das gesamte Tumorgewebe verteilt waren. (siehe **Abbildung 3-7**).

Im Vergleich zu den Ergebnissen aus der Kontrollgruppe zeigte sich in der 4-MU behandelten Versuchsgruppe, dass die proliferierenden Tumorzellen in die unter 3.1.2 beschriebenen, für HA, CD44 und RHAMM positiven (siehe **3.1.3**) Randsäume der großen Tumorzellnester umverteilt waren (siehe **Abbildung 3-7**).



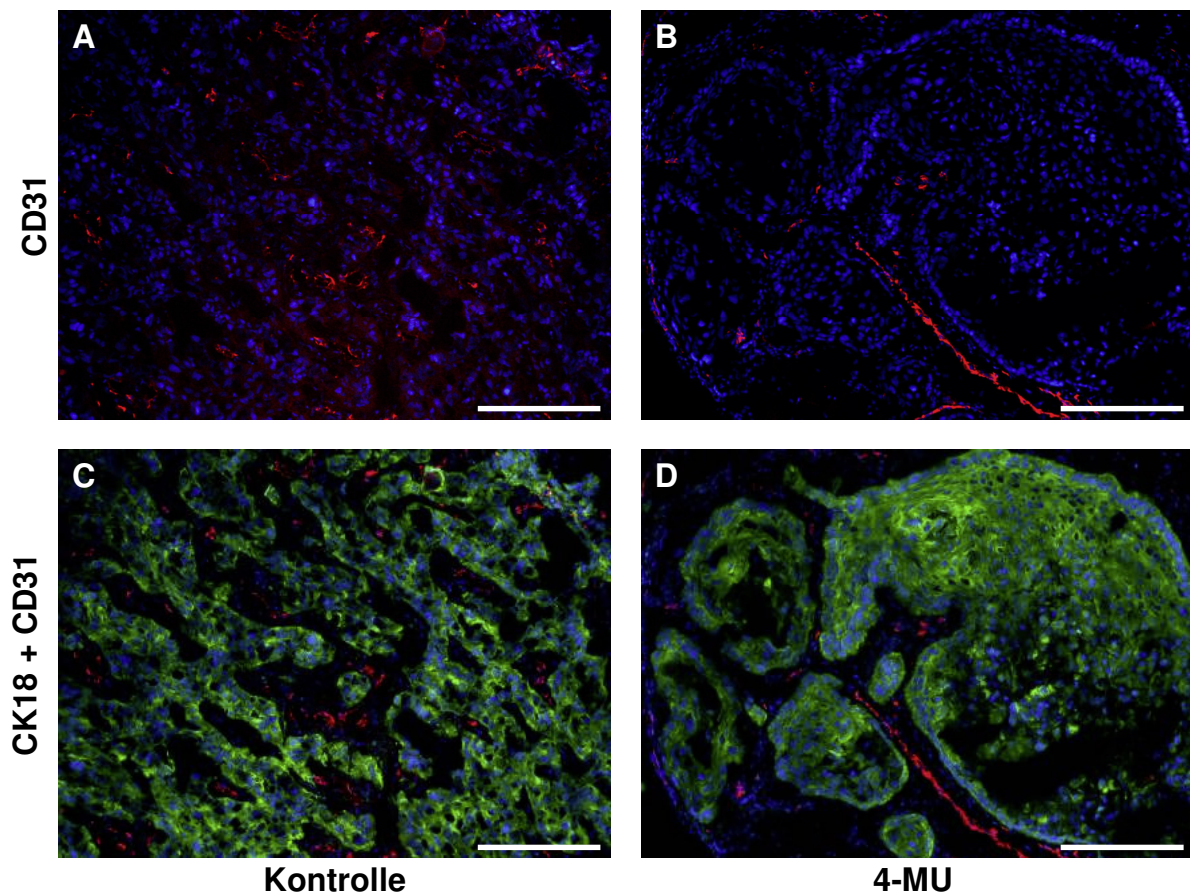


**Abbildung 3-8** Anzahl proliferierender Tumorzellen in unbehandelter Kontrollgruppe und unter 4-MU Behandlung; Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Ki67 mittels Image J und Graph Pad, \* $p < 0,05$ ,  $n = 4-5$ ,  $\pm$  SEM.

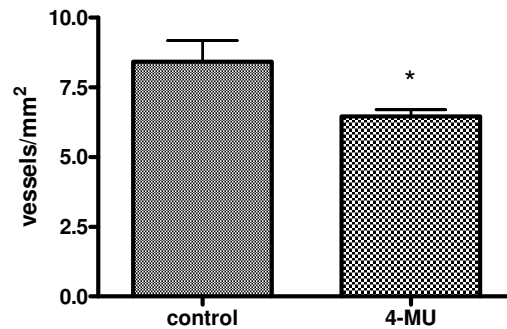
Die proliferative Aktivität innerhalb der 4-MU behandelten Versuchsgruppe war signifikant erniedrigt (proliferierende Zellen in der Kontrollgruppe:  $25\% \pm 3\%$ ; proliferierende Zellen in Gefrierschnitten der 4-MU behandelten Tumorgewebe:  $15\% \pm 3\%$ ; \* $p < 0.05$ ;  $n = 4-5$ ) (siehe **Abbildung 3-8**).

### 3.1.5 Einfluss von 4-MU auf die Vaskularisierung von OSC1-Tumorgewebe

Mittels immunhistochemischer Färbung des Endothelmarkers CD31 wurde die Mikrovaskularisierung des Tumorgewebes in Kontroll- und 4-MU behandelter Versuchsgruppe sichtbar gemacht (siehe **Abbildung 3-9 A, B**). Des Weiteren wurde eine Doppelfärbung von Zytokeratin 18 und CD31 angefertigt, welche der Lokalisationsbestimmung der Mikrovaskularisierung innerhalb der Tumore diente (siehe **Abbildung 3-9 C, D**).



**Abbildung 3-9** Veränderungen der Vaskularisierung in Kontroll- und 4-MU Gruppe, 100-fache Vergrößerung, Maßstabskalen 200  $\mu$ m, blau= Zellkerne (A,B) Färbung des Endothelmarkers CD31 (rot), Belichtungszeiten CD31= 200 ms, Kerne= 50 ms; (C,D) Doppelfärbung von Zytokeratin 18 (grün, Belichtungszeit 800 ms) und CD31 (rot, Belichtungszeit 200 ms), Kerne= 50 ms Belichtungszeit. Unter 4-MU Behandlung kommt es zu einer Lokalisation von Gefäßen ausschließlich im Stroma des Tumors und zu einer Abnahme des detektierbaren CD31 Signals. Repräsentative Aufnahmen.



**Abbildung 3-10** Anzahl der Gefäße/ mm<sup>2</sup> in unbehandeltem Kontroll- und 4-MU behandeltem OSC1-Tumorgewebe; Auswertung der immun-histochemischen Färbung von CD31 mittels Image J und Graph Pad; \* $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ,  $\pm$  SEM. In der behandelten Versuchsgruppe zeigt sich eine signifikante Abnahme der detektierten Endothelzellen innerhalb des Tumorgewebes.

Die Doppelfärbung von endothelialen Zellen durch CD31 und humanen Plattenepithelkarzinomzellen durch Zytokeratin 18 zeigte, dass sich die Vaskularisierung in den 4-MU behandelten Tumorgeweben in den unter 3.1.2 beschriebenen intratumoralen stromalen Strängen zwischen den ausgedehnten Tumorzellnestern befand. Innerhalb der nekrotischen Zentren dieser Tumorzellnester ließen sich keine Endothelzellen anfärben (siehe **Abbildung 3-9 B**).

Durch die Auswertung des CD31-RhodaminX Signals mittels Image J und Graph Pad stellte sich eine signifikant erniedrigte Gesamtanzahl von Gefäßen/mm<sup>2</sup> in der 4-MU behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zu der nicht mit 4-MU behandelten Kontrollgruppe heraus (Gefäße/mm<sup>2</sup> in der Kontrollgruppe:  $8.418 \pm 0.7572$ , Gefäße/mm<sup>2</sup> in der 4-MU behandelten Versuchsgruppe:  $6.458 \pm 0.2445$ ; \* $p < 0,05$ ,  $n = 4-5$ ) (siehe **Abbildung 3-10**).

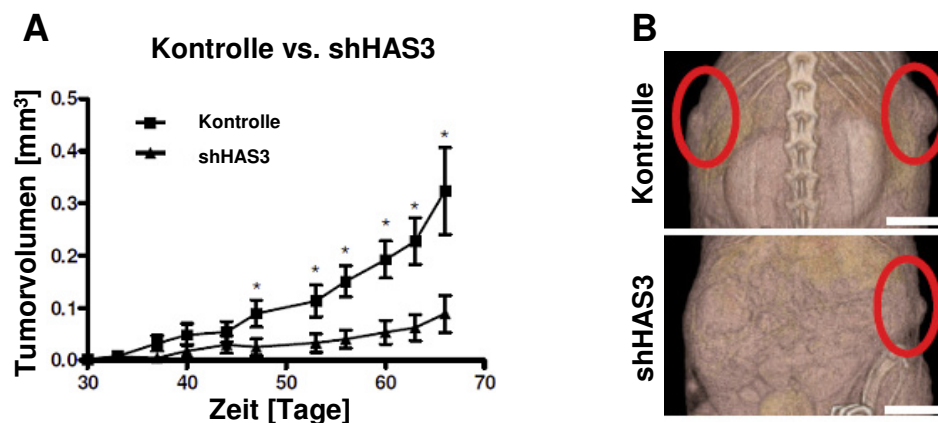
## 3.2 shHAS3

### 3.2.1 Einfluss der lentiviralen Ausschaltung der Genexpression von HAS3 auf das Wachstum von OSC1-Tumorgewebe

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Expression der Hyaluronsäuresynthase 3 (HAS3) in humanen Ösophaguskarzinomen im Vergleich zu normalem ösophagealem Mukosagewebe gesteigert ist (Twarock et al. 2010).

4-MU hemmt die Hyaluronsäuresynthase sowohl in Tumorzellen, als auch in stromalen Fibroblasten unabhängig von den involvierten HAS- Isoenzymen. Vor diesem Hintergrund wurde das Isoenzym HAS3 als die funktionell bedeutendste Hyaluronsäuresynthase der Ösophaguskarzinomzellen identifiziert (Twarock et al. 2010). Die Transduktion mit dem von unserer Arbeitsgruppe verwandten shHAS3 Lentivirus führte zu einem Knockdown der HAS3 mRNA auf  $2,0 \pm 0,6$  Prozent im Vergleich zu einem keinen Knockdown auslösenden Kontrollvirus.

Die subkutane Injektion der shHAS3 transduzierten OSC1-Zellen in die Flanken von NMRI nu/nu Mäusen führte im Versuchsverlauf zu einem signifikant erniedrigtem Tumorwachstum (siehe **Abbildung 3-11 A**).



**Abbildung 3-11** Bestimmung der Tumorgrößen im Vergleich von Kontroll- vs. shHAS3-Gruppe;

(A) mit Hilfe einer Schieblehre in regelmäßigen zeitlichen Abständen nach Injektion der Tumorzellen in die Flanken von NMRI nu/nu Mäusen; Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=6$  (Kontrolle),  $n=7$  (shHAS3),  $*p<0,05$

(B) mittels Flächendetektor-Volumen- Computertomographie (fpVCT) 65 Tage nach Injektion der Tumorzellen in die Flanken von NMRI nu/nu Mäusen. Maßstabskala 1cm, repräsentative Aufnahmen.

In der shHAS3 transduzierten Versuchsgruppe zeigten sich in A und B signifikant kleinere Tumolvolumina.

Nach 65 Tagen wurde eine Flächendetektor-Volumen-Computertomographie (fpVCT) durchgeführt. Diese zeigte, wie auch in der 4-MU Versuchsgruppe, kleinere Tumervolumina in der shHAS3-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle  $100 \pm 57,7$  % vs. shHAS3  $10,1 \pm 5,3$  %) (siehe **Abbildung 3-11 B**). Makrometastasen konnten mit Hilfe der fpVCT auch in diesem Versuchsteil weder in der Kontroll- noch in der shHAS3-Gruppe nicht nachgewiesen werden.

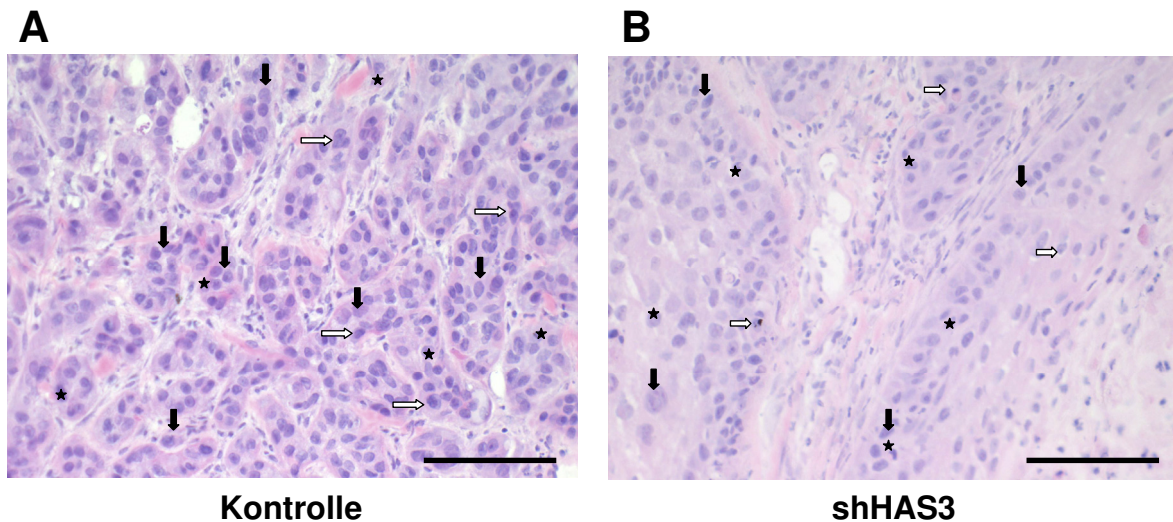
### **3.2.2 Einfluss der lentiviralen Ausschaltung der Genexpression von HAS3 auf die Morphologie von OSC1-Tumorgewebe**

Die lentivirale Ausschaltung der Genexpression von HAS3 führte zu ähnlichen morphologischen Veränderungen des OSC-1 Tumorgewebes, wie sie unter Behandlung mit 4-MU zu beobachten gewesen sind (siehe **3.1.2**).

Das mit einem nicht zur Ausschaltung der HAS3 Genexpression fähigen Virus transduzierte OSC1-Kontrolltumorgewebe ließ sich in der *Hämalaun-Eosin-Färbung* durch eine Vielzahl von kleinen Tumorzellnestern, ähnlich dem Kontrolltumorgewebe des 4-MU-Versuches, charakterisieren. Diese wurden von dünnen, intratumoralen bindegewebigen Strängen (siehe **Abbildung 3-13 C**) voneinander separiert.

Auch dieses Kontrollgewebe stellte sich als ein niedrig differenziertes Plattenepithelkarzinom mit einem aggressiven, lokal infiltrierendem und destruierendem Wachstum in den Randbereichen dar (siehe **Abbildung 3-13 A**).

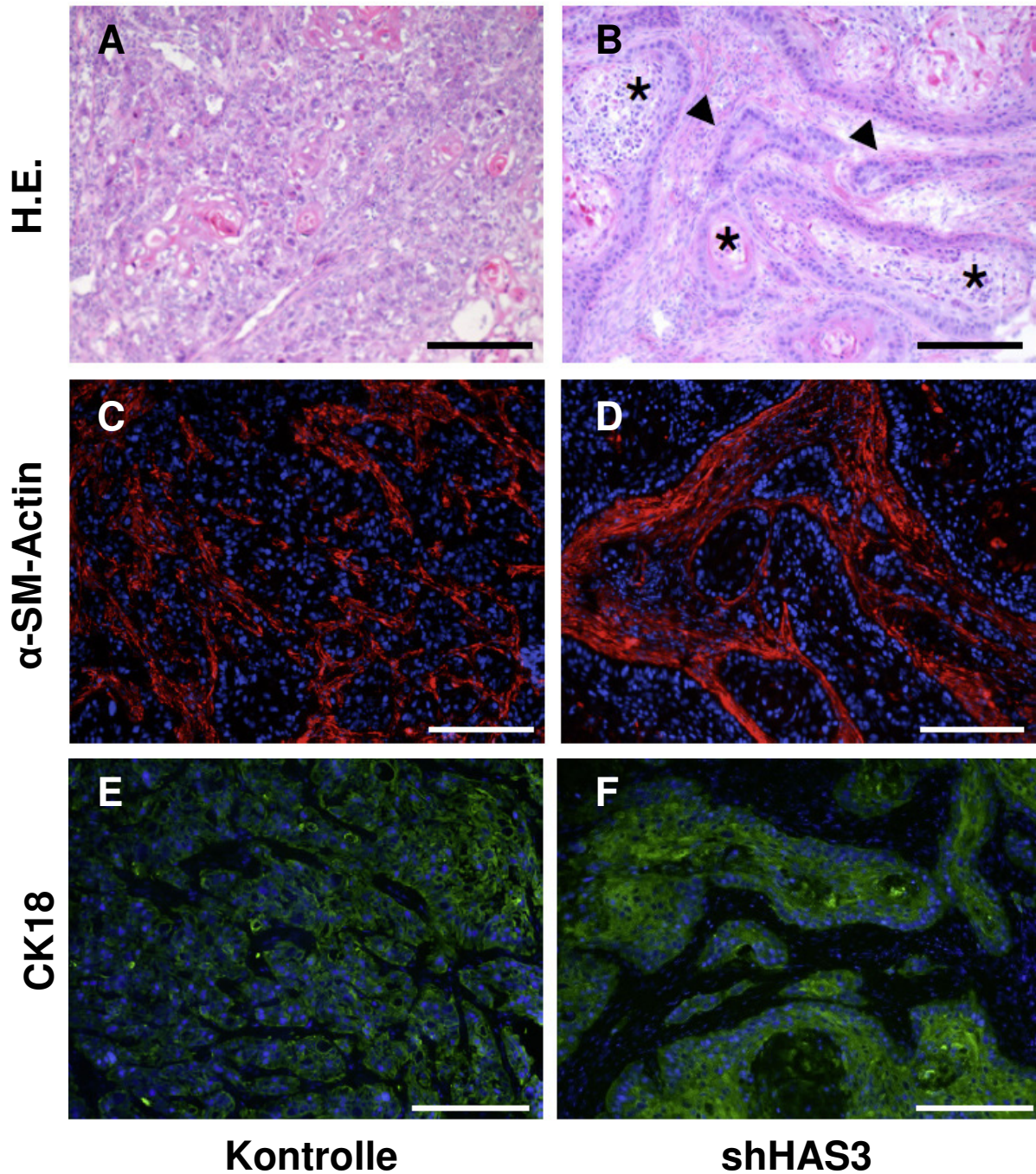
Die unter 3.1.2 beschriebenen Atypie-Merkmale (Zellpolymorphie, Anisonukleose, Zellkernpolymorphie, Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns) zur histopathologischen Malignitätsbestimmung waren auch in diesen Tumorgeweben nachweisbar (siehe **Abbildung 3-12**).



**Abbildung 3-12** Atypie-Merkmale des Kontroll- (A) und shHAS3-transduzierten (B) OSC1-Tumorgewebes, H.E., 200-fache Vergrößerung. Maßstabskala 100  $\mu$ m. Die Sternchen auf den Abbildungen zeigen in Kontroll- und shHAS3- Gruppe exemplarisch auf Anisonukleose und Zellkernpolymorphie; die schwarzen, senkrechten Pfeile deuten auf die zu Gunsten des Zellkerns verschobene Kern-Plasma-Relation und die weißen, horizontalen Pfeile zeigen exemplarisch die Zellkernhyperchromasie der Tumorzellen. Repräsentative Aufnahmen.

Das Tumorgewebe, welches sich aus shHAS3 transduzierten OSC1-Zellen entwickelt hat, stellte sich morphologisch ähnlich dar wie das mit 4-MU behandelte Tumorgewebe. Charakteristisch für die shHAS3-transduzierten Tumorgewebe waren ausgedehnte, große Tumorzellnester mit zellarmen Zentren und einem kondensierten, zellreichen Randsaum. Die einzelnen Tumorzellnester wurden von breiten, ausgeprägten bindegewebigen Strängen voneinander separiert (siehe **Abbildung 3-13 B**). Diese konnten durch die Färbung von *alpha-smooth-muscle-actin* als intratumorale stromale, murine Zellen, v.a. Fibroblasten, identifiziert werden (siehe **Abbildung 3-13 D**).





**Abbildung 3-13** Morphologische Veränderungen des OSC1-Tumorgewebes nach shHAS3-Behandlung, 100-fache Vergrößerung, Maßstabskalen 200  $\mu$ m. Blau in C-F= Zellkerne

(A,B) Hämalaun-Eosin-Färbung. Die Sternchen weisen auf zentral nekrotische Bezirke, die Pfeile auf den in der shHAS3-Gruppe gebildeten zellreichen Randsaum der Tumorzellnester hin.

(C,D) alpha-smooth-muscle-actin-Färbung (rot), Belichtungszeiten  $\alpha$ -SM= 50 ms, Kerne= 20 ms;

(E,F) CK18-Färbung (grün), Belichtungszeiten: CK18= 800 ms, Kerne= 20 ms. Repräsentative Aufnahmen.

Die spezifische Färbung der Tumorzellen wurde durch Nachweis von *humanem Zytokeratin 18* erreicht und zeigte, dass auch die lentivirale Ausschaltung der HAS3 Genexpression (ebenso wie eine Behandlung mit 4-MU siehe **3.1.2**) die Formation von Tumorzellnestern, welche durch stromales Gewebe voneinander separiert sind, forciert (siehe **Abbildung 3-13 E,F**).

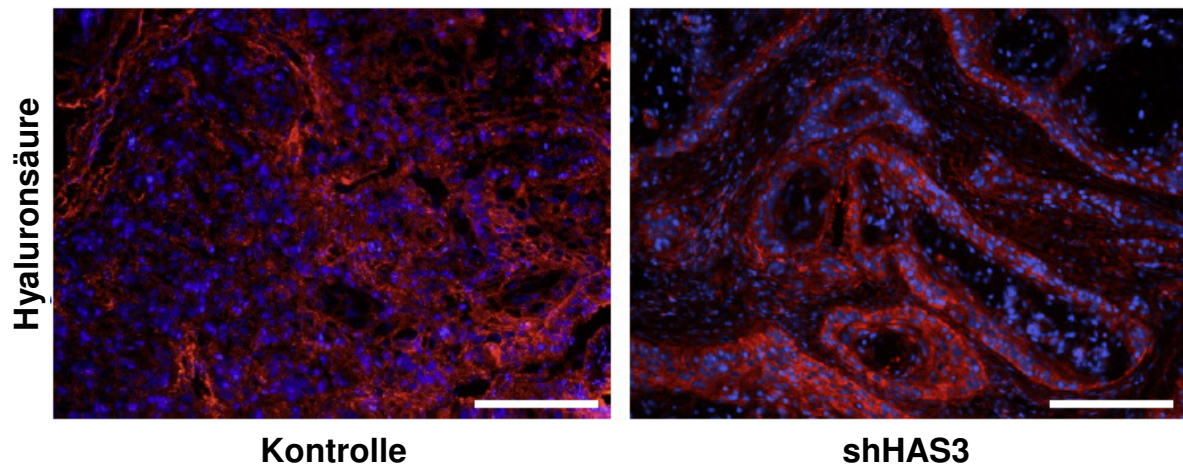
### **3.2.3 Einfluss der lentiviralen Ausschaltung der HAS3 Genexpression auf die Verteilung von Hyaluronsäure und den Hyaluronsäure-Rezeptoren CD44 und RHAMM in OSC-1 Tumorgewebe**

Die immunhistochemischen Färbungen von Hyaluronsäure mittels HAbP und den Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM zeigten ähnliche Ergebnissen wie die Versuche mit 4-MU (siehe **3.1.3**).

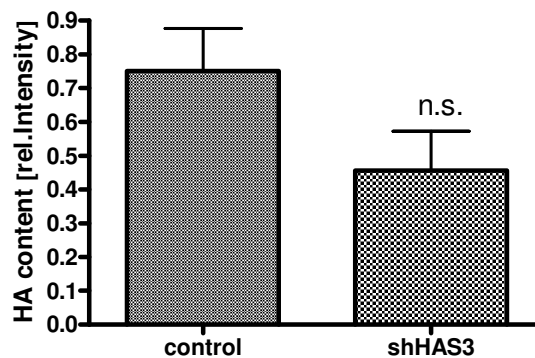
So zeigte die Färbung von Hyaluronsäure mittels HAbP im lentiviralen Versuchsteil vergleichbare Unterschiede in der Verteilung im Gewebe. Während die Hyaluronsäure im Kontrollgewebe diffus im gesamten Tumorgewebe verteilt anzufärben gewesen ist (siehe **Abbildung 3-14 A**), zeigte sich im shHAS3 transduzierten OSC1-Tumorgewebe ein ähnliches Bild wie unter 4-MU Behandlung (siehe **3.1.3**). Das Hyaluronsäuresignal war deutlich schwächer detektierbar, wobei sich statistisch nach Auswertung der Färbung mittels Image J und Graph Pad keine Signifikanz (HA-Gehalt in der Kontrollgruppe  $0.7503 \pm 0.1263$ , HA-Gehalt in der shHAS3- transduzierten Versuchsgruppe  $0.4562 \pm 0.1167$ ,  $p > 0,05$ ,  $n=6-7$ ) ergeben hat (siehe **Abbildung 3-15**).

Unter der lentiviralen Ausschaltung der Genexpression von HAS3 kam es zu einer Umverteilung des Hyaluronsäuresignals in Richtung der Randsäume der ausgedehnten Tumorzellnester. Die Hyaluronsäure war mit den Tumorzellen, nicht aber mit den intratumoralen stromalen Fibroblasten assoziiert (siehe **Abbildung 3-14**).



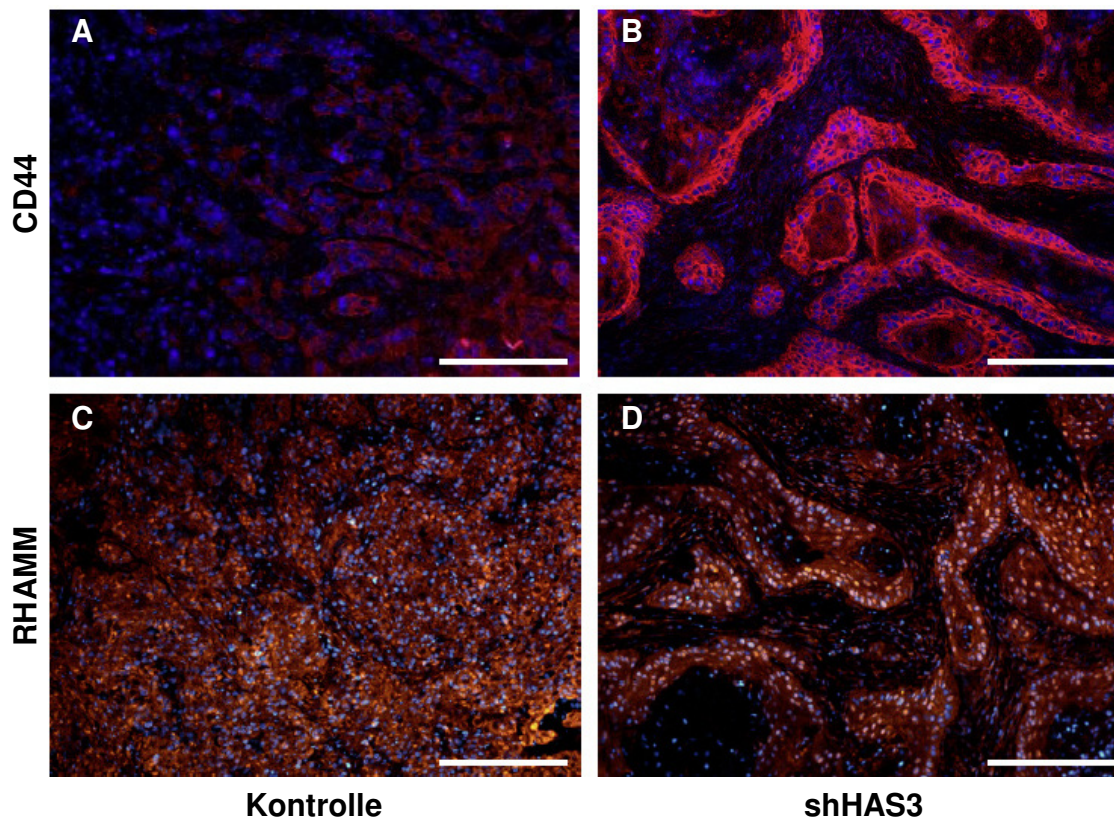


**Abbildung 3-14** Verteilung der Hyaluronsäure in OSC1-Tumorgewebe in Kontroll- und shHAS3 Versuchsgruppe. HAbP- Färbung (rot), 100-fache Vergrößerung, Maßstabskala 200  $\mu$ m, blau= Zellkerne, Belichtungszeiten HA= 75 ms, Kerne= 20 ms. In der shHAS3- Gruppe kommt es zu einer Umverteilung des HAbP-Signals im Gewebe. Repräsentative Aufnahmen.



**Abbildung 3-15** Hyaluronsäurequantifizierung. Durch Auswertung der relativen Intensitäten der HAbP-Cy3-Färbung (siehe **Abbildung 3-14**) mittels Image J und Graph Pad ermittelt;  $p > 0,05$ ,  $n = 6-7$ ,  $\pm$  SEM. Die HA-Konzentration in den shHAS3 transduzierten OSC1-Tumorgeweben sinkt im Vergleich zum Kontrolltumorgewebe.

Auch in diesem Versuchsteil wurden die oben genannten Phänomene der Umverteilung des HAbP-Cy3-Signals durch die immunhistochemische Färbung der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM weitergehend untersucht.



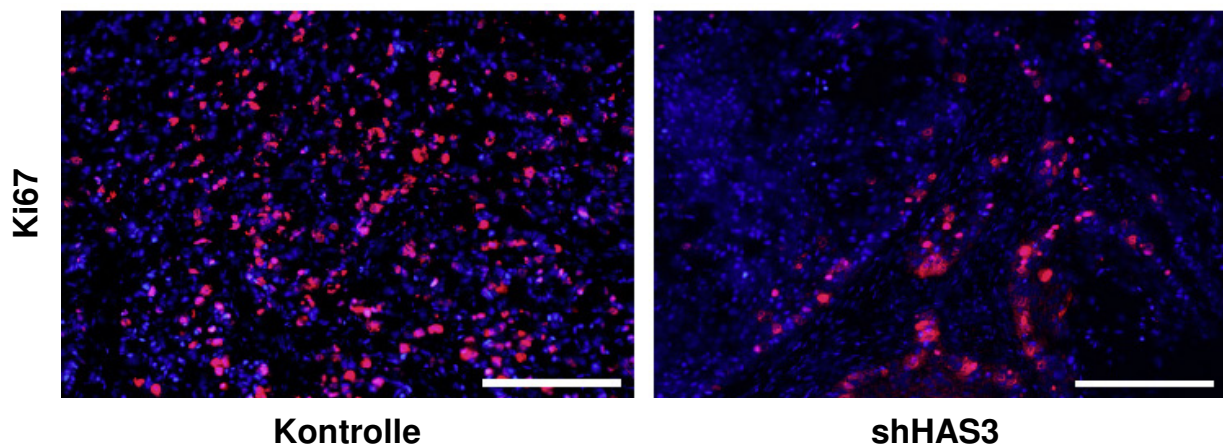
**Abbildung 3-16** Verteilung der Hyaluronsäurerezeptoren in Kontroll- und shHAS3 transduziertem Tumorgewebe; 100-fache Vergrößerung, Maßstabskalen 200  $\mu$ m, blau= Zellkerne  
 (A,B) Umverteilung von humanem CD44 (rot) an die Randsäume zwischen Tumor- und intratumoralen Stromazellen in der shHAS3- Gruppe vergleichbar mit der 4-MU Gruppe. Belichtungszeiten CD44= 200 ms, Kerne = 50 ms;  
 (C,D) RHAMM (rot) konnte in der shHAS3- Gruppe sowohl in OSC1- als auch in Stromazellen detektiert werden Belichtungszeiten: RHAMM= 40 ms, Kerne= 40 ms. Repräsentative Aufnahmen.

Die Färbung des humanen Hyaluronsäurerezeptors CD44 zeigte ein deutliches, homogen über das gesamte Gewebe verteiltes Signal in allen Tumorzellen des mit einem Kontroll-Vektor transduzierten OSC1-Tumorgewebes (siehe **Abbildung 3-16 A**). Nach lentiviraler Ausschaltung der HAS3 Genexpression scheint es zu einer Umverteilung und Hochregulierung des CD44-Rezeptors gekommen zu sein, da das Signal deutlich verstärkt und ausschließlich in der Umgebung der Tumorzellen der Randsäume der ausgedehnten, großen Tumorzellnester zu detektieren war (siehe **Abbildung 3-16 B**).

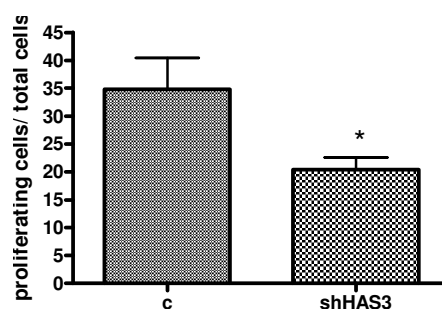
Der Hyaluronsäurerezeptor RHAMM wurde sowohl in Tumor- als auch in Stromazellen exprimiert und zeigte keine ausgeprägten Umverteilungsvorgänge in der shHAS3- Gruppe (siehe **Abbildung 3-16 C, D**).

### 3.2.4 Inhibitorische Effekte der lentiviralen Ausschaltung der HAS3 Genexpression auf die Proliferation von OSC1-Zellen in vivo

Die Anfärbung des Proliferationsmarkers Ki67 in den Tumorgeweben des lentiviralen Versuchsteils diente zum einen der Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen der Inhibition von Tumorprogression und vermindertem Tumolvolumen. Zum anderen sollte ein Vergleich zwischen der 4-MU und der shHAS3 Gruppe stattfinden.



**Abbildung 3-17** Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 (rot) in Kontroll- und shHAS3-transduziertem OSC1-Tumorgewebe. Proliferationsrückgang und – Umverteilung der proliferierenden Zellen in der shHAS3-transduzierten Versuchsgruppe. 100-fache Vergrößerung, Maßstabskala 200  $\mu$ m; blau= Zellkerne, Belichtungszeiten Ki67= 100 ms, Kerne= 100 ms. Repräsentative Aufnahmen.



**Abbildung 3-18** Proliferierende Tumorzellen in Kontroll- und shHAS3-transduzierter Versuchsgruppe; Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Ki67 mittels Image J und Graph Pad; \* $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ,  $\pm$  SEM.

In der Kontrollgruppe zeigte sich eine Vielzahl an proliferierenden Tumorzellen, welche über das gesamte Tumorgewebe verteilt waren (siehe **Abbildung 3-17**).

Im Vergleich dazu zeigte sich in der 4-MU behandelten Versuchsgruppe, dass die proliferierenden Tumorzellen in die unter 3.2.2 beschriebenen, für HA, CD44 und

RHAMM positiven (siehe **Abbildung 3-14**) Randsäume der nach lentiviraler Ausschaltung der HAS3 Genexpression gebildeten, großen Tumorzellnester umverteilt waren (siehe **Abbildung 3-17**).

In den shHAS3 transduzierten OSC1-Tumorgeweben war die Anzahl proliferierender Tumorzellen signifikant erniedrigt (proliferierende Zellen in der Kontrollgruppe: 35%  $\pm$  6%; proliferierende Zellen in shHAS3 transduzierten OSC1-Tumorgeweben: 20%  $\pm$  2%;  $p < 0.05$ ;  $n = 7$ ) (siehe **Abbildung 3-18**).

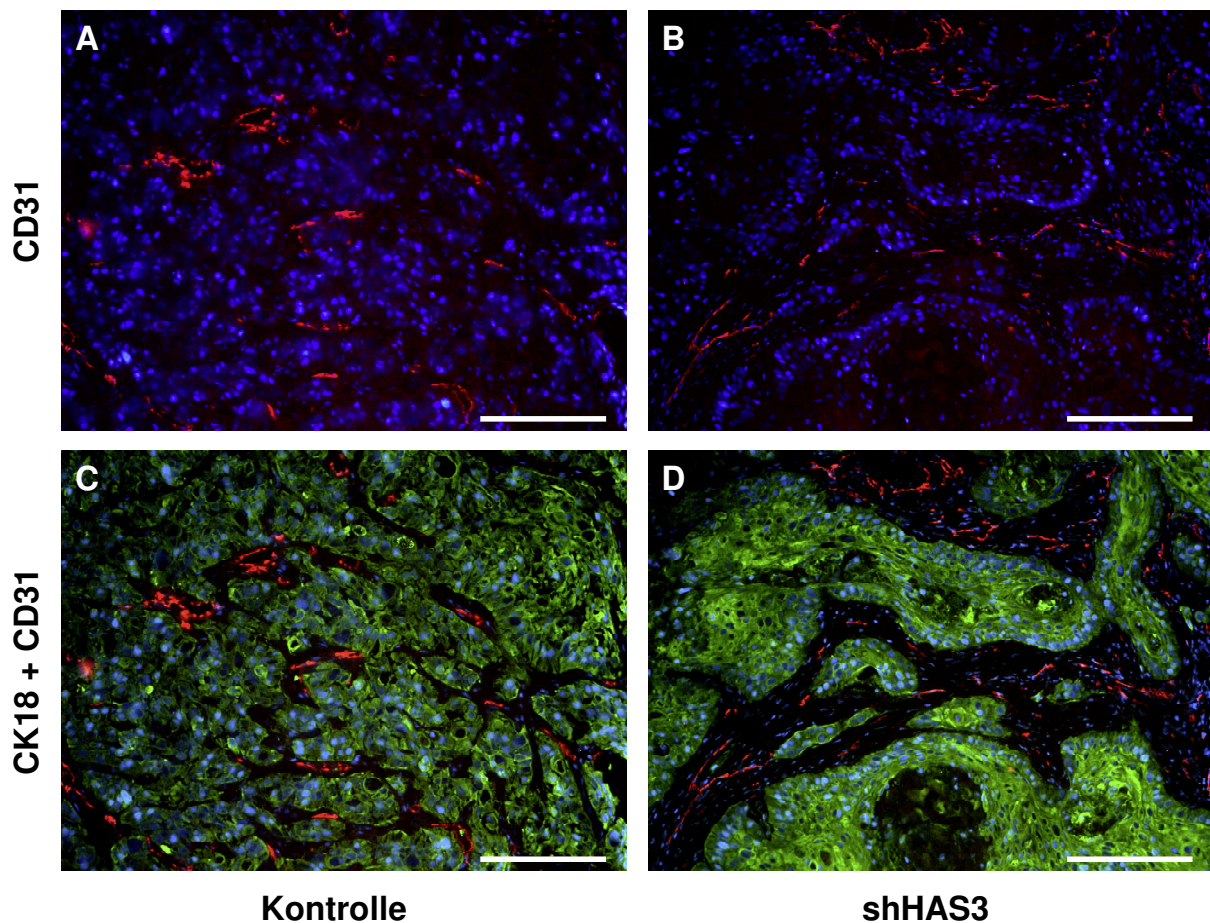
Unter 4-MU Behandlung kam zu einem vergleichbaren Rückgang der Proliferation, sowie Umverteilung der proliferierenden Zellen in die für HA, CD44 und RHAMM positiven Randsäume der gebildeten ausgedehnten Tumorzellnester.

Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass eine Inhibition der HAS3-vermittelten Hyaluronsäuresynthese von OSC1-Zellen die Möglichkeit bietet, die Proliferation und Progression von plattenepithelialen Karzinomen des Ösophagus zu hemmen und durch eine Umgestaltung des intratumoralen Stromas einen höher differenzierten Phänotyp zu bedingen.



### 3.2.5 Einfluss der lentiviralen Ausschaltung der HAS3 Genexpression auf die Vaskularisierung von OSC1-Tumorgewebe

Die immunhistochemische Färbungen des Endothelmarkers CD31 sowie die Doppelfärbung von Zytokeratin 18 und CD31 wurden auch in der shHAS3-transduzierten OSC1-Tumorgewebe-Versuchsgruppe durchgeführt.

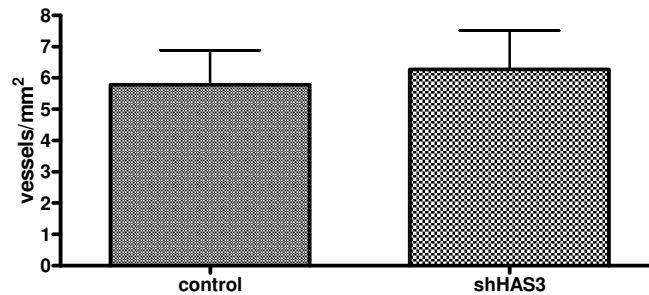


**Abbildung 3-19** Veränderungen der Vaskularisierung in Kontroll- und shHAS3-transduziertem OSC1-Tumorgewebe, 100-fache Vergrößerung, Maßstabskalen 200  $\mu\text{m}$ . Blau= Zellkerne

(A,B) Färbung des Endothelmarkers CD31 (rot) Belichtungszeiten CD31= 200 ms, Kerne= 50 ms);

(C,D) Doppelfärbung von Zytokeratin 18 (grün, Belichtungszeit 800 ms) und CD31 (rot, Belichtungszeit 200 ms) Kerne Belichtungszeit 50 ms.

In der shHAS3-Gruppe kam es zu einer Lokalisation von Gefäßen ausschließlich im Stroma des Tumors. Es zeigte sich keine Abnahme des detektierbaren CD31 Signals. Repräsentative Aufnahmen.



**Abbildung 3-20** Anzahl der Gefäße/mm<sup>2</sup> in Kontroll- und shHAS3-transduzierterem OSC1-Tumorgewebe. Auswertung der immunhistochemischen Färbung von CD31 mittels Image J und Graph Pad;  $p > 0,05$ ,  $n = 6-7$ ,  $\pm$  SEM. In der shHAS3 transduzierten Versuchsgruppe zeigte sich keine signifikante Änderung des Endothelsignals innerhalb des Tumorgewebes.

Die Färbung der Gefäßendothelzellen mittels CD31 zeigte histologisch keinen eindeutigen Unterschied hinsichtlich der angefärbten Gefäßendothelien in shHAS3-transduzierten OSC1-Tumorgeweben im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe **Abbildung 3-19 B**). In der Doppelfärbung von Zytokeratin 18 und CD31 zeigte sich, wie auch in der 4-MU behandelten Versuchsgruppe, dass die Gefäße ausschließlich im intratumoralen Stroma, nicht jedoch innerhalb der gebildeten Tumorzellnester gelegen waren (siehe **Abbildung 3-19 D**).

Auch durch Auswertung der detektierten CD31-RhodaminX Signale mittels Image J und Graphpad zeigte sich in der shHAS3- Versuchsgruppe keine Abnahme der Gefäße/mm<sup>2</sup> Tumorgewebe (Anzahl Gefäße/mm<sup>2</sup> Tumorgewebe in der Kontrollgruppe:  $5.782 \pm 1.101$ , Anzahl Gefäße/mm<sup>2</sup> Tumorgewebe in der shHAS3 transduzierten Versuchsgruppe:  $6.269 \pm 1.239$ ,  $p > 0,05$ ,  $n = 6-7$ ) (siehe **Abbildung 3-20**).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse aus Teil 3.2 der Arbeit, dass der tumorzellspezifische Knockdown von HAS3 zu vergleichbaren Effekten denen einer systemischen Behandlung mit 4-MU auf das Tumorgewebe geführt hat. Die HAS3 medierte Hyaluronsäuresynthese von OSC1-Zellen scheint somit essentiell für die Tumorprogression zu sein.

Als einziger möglicherweise bedeutsamer Unterschied zeigte sich die Menge der CD31-positiven Zellen durch shHAS3 unverändert, während 4-MU eine deutliche Veränderung bewirkte.

## 4 Diskussion

### 4.1 Bedeutung der Hyaluronsäure in der Tumorprogression, der Ausbildung des Tumorphänotyp und der Proliferation

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden durchgeführt, um unser Verständnis von der Rolle der Hyaluronsäuresynthese für die Entwicklung von humanen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zu erweitern. Des Weiteren dienen die Experimente dem Versuch, die Rolle der von *Tumorzellen abgeleiteter* mit der von *Stromazellen abgeleiteter* Hyaluronsäure zu vergleichen. Dafür wurde das Ansprechen von heterotransplantierten Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus auf eine systemische Veränderung der Hyaluronsäuresynthese im Vergleich zu einer spezifischen Tumorzell- Interferenz der Hyaluronsäuresynthese untersucht.

Wie unter 3.1.3 beschrieben, konnte Hyaluronsäure in den unbehandelten OSC1-Kontrolltumoren homogen über das gesamte Tumorgewebe verteilt nachgewiesen werden. In den mit 4-MU behandelten Tumoren kam es zu einer signifikanten Abnahme der Hyaluronsäurekonzentration und einer Umverteilung des detektierten Signals zu den Tumorzell-Stroma-Grenzen. Auch eine genetische Veränderung der HAS3 Expression der Tumorzellen führte zu einer vergleichbaren Umverteilung und Abnahme des Hyaluronsäuresignals (siehe **3.1.3** und **3.2.3**).

In humanen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus akkumuliert Hyaluronsäure sowohl im Parenchym als auch im Stroma und wird sowohl von Tumor- als auch Stromazellen produziert (Wang et al. 1996; Twarock et al. 2009). Initial wird von einer hohen Hyaluronsäurekonzentration in Plattenepithelkarzinomen ausgegangen, welche mit einer Progression zu einem undifferenzierten, aggressiven Karzinom abzunehmen scheint. Dieses Ergebnis scheint ein prognostischer Marker für eine schlechte Prognose für die Patienten zu sein (Kosunen et al. 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass die Hyaluronsäuresynthese alleine nicht ausreichend für die maligne Entartung einer Zelle ist (Itano et al. 2008). Durch Hyaluronsäurebindende Proteine und Hyaluronsäurerezeptoren wird jedoch die Bildung einer für Tumorzellen günstigen Mikroumgebung gefördert, welche die Bildung und spätere Aufrechterhaltung eines malignen Phänotypen der Karzinomzellen sowie die Rekrutierung von Stromazellen in das tumoröse

Geschehen und dadurch die Progression des malignen Tumors unterstützt (Tammi et al. 2008). Die Bedeutung von stromalen Hyaluronsäurebindenden Proteinen konnte 2009 für das Proteoglykan Versican, welches die Invasion und Retention von inflammatorischen Zellen in murine Lewis Bronchial-Karzinome und deren Metastasierung fördert, nachgewiesen werden (Kim et al. 2009).

Als ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass heterotransplantierte humane OSC1-Zellen mit einer genetisch reduzierten HAS3 Expression in vergleichbarem Umfang sowohl zu einer Inhibition der Tumorprogression als auch zu einem auffällig ähnlichen Tumorphänotypen, wie durch eine systemische Hemmung der Hyaluronsäuresynthese bedingt, führen (siehe Ergebnisse unter **3.1.1**, **3.2.1**, **3.1.2**, **3.2.2**).

Insbesondere konnte unter Behandlung mit 4-MU bzw. nach genetischer Hemmung der HAS3 Expression die Ausbildung eines höher differenzierten Tumorphänotypen und eine deutliche Ausbildung von stromalen Strängen zwischen den gebildeten Tumorzellnestern sowie weniger vereinzelt liegende Tumorzellen und eine reduzierte Proliferation der Tumorzellen beobachtet werden (siehe **3.1.2**, **3.2.2**). Demzufolge konnte gezeigt werden, dass trotz der wachsenden Bedeutung von stromaler Hyaluronsäure die von Tumorzellen mediierte Hyaluronsäuresynthese eine wichtige Rolle in diesem Modell von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus spielt.

Die Hemmung dieser heterotransplantierten Ösophaguskarzinome durch 4-MU fügt sich in eine Reihe von Studien ein, die gezeigt haben, dass 4-MU eine „*Anti-Tumor Aktivität*“ besitzt. Diese konnten zeigen, dass 4-MU die Bildung von Lebermetastasen des malignen Melanoms hemmt und zu einer Sensibilisierung von Pankreas- bzw. Mammakarzinomzellen für die Behandlung mit Gemcitabin bzw. Trastuzumab führt (Yoshihara et al. 2005; Nakazawa et al. 2006; Palyi-Krekk et al. 2007) .



## 4.2 Bedeutung der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM in OSC1- Ösophaguskarzinomen

Interessant ist auch das Ergebnis, dass sowohl 4-MU als auch gegen Tumorzellen gerichtete shHAS3 zu einer ausgeprägten Umverteilung des Hyaluronsäurerezeptors CD44 in die direkte Umgebung von neu formierten, groß ausgedehnten Tumorzellnestern geführt hat (siehe **3.1.3, 3.2.3**). Des Weiteren ist auch die restliche verbleibende proliferative Aktivität der Tumorzellen und der größte Anteil der anfärbaren Hyaluronsäure auf diese CD44-positive Tumorzell-Stroma-Grenze beschränkt gewesen (siehe **Abbildung 3-7, Abbildung 3-17**). Im Gegensatz dazu blieb RHAMM über das gesamte Tumorgewebe verteilt (siehe **Abbildung 3-4, Abbildung 3-16**).

In der Vergangenheit ist CD44 als begünstigender Faktor für die Progression von Blasen- und Ovarialkarzinomen in Übereinstimmung mit einer von den Tumorzellen abgeleiteten HAS1 Expression identifiziert worden (Bourguignon et al. 2007; Golshani et al. 2008)

Obwohl die vorliegenden Ergebnisse keinen Rückschluss darauf erlauben, ob und in welchem Umfang die zwei untersuchten Hyaluronsäurerezeptoren an der Tumorprogression mitwirken, ist eine mögliche Interpretation, dass es nach einer Hemmung der Hyaluronsäuresynthese zu einer CD44 mediierten Signalkaskade kommt, welche zu der verbleibenden proliferativen Aktivität der OSC1-Zellen an der Tumor-Stroma-Grenze führt.

In diesem Kontext sind weitere Studien notwendig, um die Rolle der Hyaluronsäurerezeptoren in humanen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zu untersuchen.

### **4.3 Vergleich von 4-MU und shHAS3 Effekten**

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass die Hemmung eines spezifischen tumorzellassozierten Hyaluronsäuresynthase-Isoenzym (HAS3) vergleichbar effizient wie eine systemische Hyaluronsäuresynthesehemmung durch 4-MU ist. Des Weiteren ist dies die erste systematische Untersuchung über die Relevanz von Hyaluronsäuresynthase und spezifischer Hyaluronsäuresynthase-Isoenzymen in Ösophaguskarzinomen.

Die erzielten Ergebnisse stehen im Einklang mit der Erkenntnis, dass humane Plattenepithelkarzinome des Ösophagus vor allem die Hyaluronsäuresynthase-Isoform 3 (HAS3) zur Hyaluronsäureproduktion nutzen. Hierdurch kommt es zu einer hohen Proliferation und einem aufgelockert wachsenden Verbund von Tumorzellen. Ein möglicher Abbau von hochmolekularer Hyaluronsäure zu kleineren Fragmenten scheint an der Tumorprogression beteiligt zu sein. Dieser Effekt wurde schon zuvor für andere Tumore vermutet (Bharadwaj et al. 2007). Bisherige Veröffentlichungen zeigen, dass in Prostatakarzinomen die Hyaluronsäuresynthasen HAS3 und HAS2 als für die Hyaluronsäureproduktion essentiell identifiziert werden konnten. Zudem wurde gezeigt, dass diese durch Hyaluronidase 1 zu kleineren Fragmenten abgebaut wird, welche die Tumorprogression und Metastasierung fördern (Simpson 2006; Bharadwaj et al. 2007; Bharadwaj et al. 2009).

In Zukunft bleibt zu diskutieren, ob zusätzlich zu der von uns durchgeführten Ausschaltung der Genexpression von HAS3 auch eine Ausschaltung der Genexpression der anderen an der Tumorformation beteiligten HAS-Isoformen sinnvoll sein könnte, um die Effekte und Auswirkungen dieser auf die Tumorprogression und den Phänotypen zu untersuchen. Es konnte in der Vergangenheit in quantitativen Realtime-PCR-Bestimmungen gezeigt werden, dass OSC1-Zellen keine signifikante Genexpression von HAS1, eine moderate HAS2-Expression und ein starkes Signal für HAS3-mRNA zeigen (Twarock et al. 2009; Twarock et al. 2010). Obwohl in OSC1-Zellen gezeigt wurde, dass HAS2 weit weniger stark als HAS3 exprimiert wird, kann eine Interferenz mit den hier untersuchten Vorgängen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um die Ergebnisse dieser Arbeit weitergehend zu evaluieren, wurde von unserer

Arbeitsgruppe HAS2 *in vitro* lentiviral ausgeschaltet (Twarock et al. 2010). Prospektiv erscheint es sinnvoll, eine weitere *in vivo* Versuchsreihe an diese hier dargestellten Versuche anzuschließen.

Auf der Basis der vorliegenden *in vivo* Ergebnisse erscheint es als besonders wichtig, die Faktoren, welche HAS3 in humanen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus regulieren, zu bestimmen.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass HAS3 in humanen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus hochreguliert wird. Interessanterweise war zugleich der EGF-Rezeptor (EGFR, ErbB1) in 40-90% der untersuchten Tumore entweder über- oder konstitutiv exprimiert. Eine Überexpression von EGFR ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Ozawa et al. 1987; Shimada et al. 1999). Eine Induzierung der HAS3 Expression durch EGF und ErbB2 konnte ebenfalls für Keratinozyten und Prostatakarzinomzellen gezeigt werden (Pasonen-Seppanen et al. 2003; Bourguignon et al. 2007; Pasonen-Seppanen et al. 2008). Auch für die in dieser Arbeit verwendeten OSC1-Zellen konnte eine erhöhte HAS3 Expression in Antwort auf EGF festgestellt werden (Twarock et al. 2010).

Mit den vorliegenden Ergebnissen zusammengenommen sollte bedacht werden, dass EGF ein wichtiger Regulator der HAS3 Expression in humanen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zu sein scheint. Diese könnte besonders für Karzinome, die bekannterweise auf eine Hemmung von EGF ansprechen, wie Kopf-/Hals-Plattenepithelkarzinome und metastasierende kolorektale Karzinome, interessant sein.

Zusammengefasst kann man sagen, dass Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus HAS3 überexprimieren und dass diese Überexpression einen niedrig differenzierten, stark proliferierenden Tumorzellphänotypen bedingt.

#### **4.4 Bedeutung der Hyaluronsäure für die Vaskularisierung des Tumorgewebes**

Nachdem in den bisherigen Ausführungen die Bedeutung der Hyaluronsäure für die Tumorprogression, die Ausbildung des Tumorphänotypen und die Proliferation der Tumorzellen diskutiert wurde, möchte ich nun auf die Bedeutung der Hyaluronsäure für die Vaskularisierung des Tumorgewebes eingehen.

Die vorliegenden Versuche zur Vaskularisierung von mit 4-MU behandeltem OSC1-Tumorgewebe im Vergleich zu unbehandeltem OSC1-Kontrolltumorgewebe haben ergeben, dass 4-MU die Mikrovaskularisierung des histologisch untersuchten Tumorgewebes hemmt (siehe 3.1.5). In beiden Versuchgruppen kam es nicht zu einer Ausbildung von Makrometastasen.

Mit Hilfe der CD31-Färbung der Tumore, in denen lentiviral die HAS3 Expression ausgeschaltet wurde ließ sich der hemmende Effekt von 4-MU auf der Ebene der Mikrovaskularisierung nicht reproduzieren (siehe 3.2.5).

Für diese Ergebnisse scheinen verschiedene Erklärungsansätze denkbar.

4-MU wurde den NMRI nu/nu Mäusen auf oralem Wege als Futterzusatz systemisch zugeführt und wirkt daher sowohl auf die humanen OSC1-Zellen als auch auf die murinen Stromazellen hemmend. In dem durchgeführten Versuch bleibt daher unklar, ob es sich bei der Reduzierung der Tumormikrovaskularisierung um einen Effekt der Hyaluronsäureinhibition auf Ebene der OSC1-Zellen oder der beteiligten Stromazellen handelt. Dieser systemische Effekt von 4-MU konnte 2010 in einem heterotransplanten Tumormodell für Melanom- und beteiligte stromale Zellen nachgewiesen werden (Edward et al. 2010). Vigetti et al. haben 2009 gezeigt, dass durch 4-MU sowohl die Hyaluronsäuresynthese als auch die Proliferation und Beweglichkeit von humanen aortalen glatten Muskelzellen gehemmt wird und es daher zu einer verminderten Migration dieser Zellen kommt (Vigetti et al. 2009).

Aufgrund der Tatsache, dass es durch eine lentivirale Ausschaltung der HAS3 Genexpression nicht zu einer Abnahme der Mikrovaskularisierung des Tumorgewebes gekommen ist, eröffnen sich *folgende Möglichkeiten der Diskussion* der Ergebnisse:

Zum einen wäre es denkbar, dass nicht HAS3 sondern HAS2 an der Ausbildung der Vaskularisierung im Tumorgewebe beteiligt ist und es dadurch nicht zu einer Abnahme der Vaskularisierung nach Ausschaltung der HAS3 Expression gekommen ist. Gegen diese These spricht, dass durch 4-MU sowohl HAS3 als auch HAS2 gehemmt werden und es unter 4-MU Behandlung zu einer signifikanten Abnahme der Tumormikrovaskularisierung kommt.

Zudem bleibt zu bedenken, dass durch die lentivirale Ausschaltung der Genexpression von HAS3 in den humanen OSC1-Tumorzellen die murinen Stromalen Zellen unbeeinflusst geblieben sind. Daher sollte in Erwägung gezogen werden, dass die Vaskularisierung nicht von den Tumorzellen selbst, sondern von den murinen Stromalen Zellen beeinflusst werden könnte. Diese These wird von den oben genannten Ergebnissen von Vigetti et al. gestützt (Vigetti et al. 2009).

In diesem Kontext könnte eine weitere Versuchsreihe, zum Beispiel an Cre-Lox rekombinierten Mäusen, zu einer Klärung dieses Problems führen. Diese Mäuse müssten genetisch so verändert sein, dass in ihnen selektiv die HAS3 Expression der murinen Fibroblasten gehemmt wird, damit die Effekte der Stromalen Zellen auf die Mikrovaskularisierung des Tumors von den Effekten der durch shHAS3 veränderten humanen OSC1-Zellen differenziert werden können.

Die Cre-Lox Rekombination wurde 1987 das erste Mal von Sauer beschrieben (Sauer 1987). Hierbei handelt es sich um eine DNA-Sequenz spezifische Rekombinationstechnik. Cre steht für zyklisches Rekombinierungsprotein und ist eine DNA-spezifische Rekombinase, welche die Rekombinierung zwischen spezifischen DNA-Sequenzen katalysiert. LoxP ist eine Sequenz des Genoms der Bakteriophage P1, welche als Stopp-Signal fungiert. Benötigt werden eine Cre-Maus und eine LoxP-Maus. Nach Kreuzung der beiden Versuchsmäuse werden die LoxP-Stopp-Signale von Cre erkannt und die zwischen den beiden LoxP-Signalen liegende DNA-Sequenz wird von Cre aus der DNA herausgeschnitten.

Die entstehenden freiliegenden DNA-Enden werden im nächsten Schritt mit Hilfe der DNA-Ligase erneut miteinander verknüpft. Somit entsteht eine rekombinante Cre-Lox Maus, auf deren Genom eine spezifische Sequenz nicht mehr codiert ist und somit zu einem selektiven Knockout dieser führt (Sauer 1998; Bucholtz 2008).

Zur Untersuchung der Effekte von muriner, stromaler HAS3 Expression wäre eine transgene Maus erforderlich, welche LoxP-Sequenzen aufweist, die die HAS3 flankieren und somit nach Kreuzung mit einer Fibroblasten-spezifischen Cre-Rekombinanten-Maus die Ausschaltung der HAS3 zum Beispiel in Fibroblasten ermöglicht.

## 4.5 Ausblick

Die durchgeführten Versuche zeigten eine Veränderung des undifferenzierten Phänotypen des unbehandelten OSC1-Kontrolltumorgewebes zu einem höher differenzierten Tumorphänotypen nach 4-MU Behandlung. Diese konnte durch die Versuche mit shHAS3 als tumorzellspezifisch- Hyaluronsäure- mediiert identifiziert werden. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass es sich bei 4-MU um einen erfolgversprechenden Ansatzpunkt und Arzneistoff für die Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus handeln könnte.

Auch die HAS3 medierte Hyaluronsäuresynthese scheint ein potentieller therapeutischer Ansatzpunkt für die medikamentöse Therapie des Ösophaguskarzinoms zu sein, den es in Zukunft durchaus zu bedenken und weitergehend zu untersuchen gilt.

Durch die in dieser Arbeit unternommene Untersuchung der Proliferation von heterotransplantierten Ösophaguskarzinomzellen, bei der sowohl 4-MU als auch shHAS3 einen eindeutig hemmenden Effekt auf die Krebszellen aufwiesen, ist der Beweis erbracht, dass die beobachteten Veränderungen im Phänotyp der Tumore funktionelle Relevanz aufweisen.

In Zukunft sollten weiterführende *in vivo* Versuche in Bezug auf die Effekte und Auswirkungen der Hyaluronsäuresynthase-Isoform 2 unternommen werden, da diese von Ösophaguskarzinomzellen zwar weit weniger stark als HAS3 exprimiert wird, eine Interferenz mit den hier untersuchten Vorgängen jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

In zweiter Instanz wäre eine Evaluierung der Wirksamkeit von 4-MU in Kombination zu klassischen Tumortheraeutika in klinischen Studien wünschenswert, um so möglicherweise die Ansprechbarkeit zu verbessern oder die Nebenwirkungen zu reduzieren.

## 4.6 Fazit

Die vorliegende Arbeit zeigt die Wirkung einer *pharmakologisch induzierten, systemischen Verarmung* der Hyaluronsäurematrix von OSC1- und Stromazellen bzw. einer *lentiviral induzierten spezifischen Verarmung* der OSC1-Zellen an HAS3 auf den Phänotyp, die Progression, Proliferation und Vaskularisierung des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die von den Tumorzellen gebildete Hyaluronsäurematrix eine wichtige Rolle in der Ausbildung eines niedrig differenzierten, aggressiv wachsenden und metastasierenden Ösophaguskarzinoms spielt.

Im Detail konnte gezeigt werden, dass es durch die pharmakologisch bzw. lentiviral induzierte Verarmung der Karzinomzellen an Hyaluronsäure zu einer Umgestaltung des Tumorgewebes zu einem höher differenzierten, weniger aggressiv wachsenden Phänotyp mit einer erniedrigten Proliferation und Progression gekommen ist.

Diese Beobachtungen zeigten eindrucksvoll die Bedeutung des Hyaluronsäuresystems für die Progression von humanen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.



## 5 Zusammenfassung

Das Ösophaguskarzinom gehört heute zu den sechs häufigsten Gründen für einen tumorassoziierten Tod der Patienten. Hyaluronsäure (HA) ist ein Polysaccharid, welches sowohl im Parenchym als auch im Stroma von humanen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus induziert wird. Eine überschießende Produktion an Hyaluronsäure in der Umgebung von gastrointestinalen Tumorzellen ist ein wichtiges Merkmal dieser Erkrankung. Hyaluronsäure ist für eine Vielzahl von malignen Eigenschaften von Krebszellen, wie ein erhöhtes invasives Potential, Proliferation und Neigung zur Metastasierung verantwortlich.

4-Methylumbelliferon (4-MU) ist ein Inhibitor der Hyaluronsäuresynthasen (HAS1-3), dem eine antikanzerogene Wirkung zugeschrieben wird.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob eine Inhibierung der HA-Synthese die Progression von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus beeinflusst. Es wurde eine humane plattenepitheliale Ösophaguskarzinomzelllinie (OSC1) mit einem HAS-Expressionsmuster HAS3>HAS2>>>HAS1 ausgewählt, Diese Zellen wurden in NMRI nu/nu Mäuse xenotransplantiert und die Effekte von 4-MU und einem lentiviralen Knockdown von HAS3 auf die Tumorprogression untersucht. Die Tumorprogression wurde mittels regelmäßiger Messungen mit Hilfe einer Schieblehre und am Ende der experimentalen Periode durch eine fpVCT quantifiziert. Anschließend wurden die Tumore histologisch auf ihren HA Gehalt, den zellulären Phänotyp, ihre Proliferation (Ki67) und Vaskularisierung (CD31) untersucht.

Im Verlauf einer siebenwöchigen 4-MU Behandlung kam es zu einer Inhibition der Tumorprogression, einer Umgestaltung des Tumors in einen höher differenzierten Phänotyp sowie zu einer Abnahme von Proliferation und Vaskularisierung. Der lentivirale Knockdown von HAS3 in humanen OSC1-Zellen führte zu einer Kopie der durch 4-MU Behandlung ausgelösten Effekte in Hinsicht auf histopathologische Umgestaltung, Abnahme von Proliferation und Tumorprogression. Die Vaskularisierung blieb durch den lentiviralen Knockdown von HAS3 unbeeinflusst.

Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass eine systemische Inhibition der HA-Synthese und ein spezifischer Knockdown von HAS3 in Tumorzellen eine Möglichkeit darstellen, die Progression von Ösophaguskarzinomen herabzusetzen und somit

einen möglichen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Ösophaguskarzinomtherapie bieten.

## 6 Summary

Esophageal carcinoma is one of the six most frequent causes of tumor related death today. Hyaluronan (HA) is a polysaccharide component that is induced in the parenchyma and stroma of human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Abundant production of hyaluronic acid (HA) in the neighbourhood of gastrointestinal cancer cells is a hallmark of tumor development. Hyaluronan accounts for a multiplicity of malignant properties of cancerous phenotype such as invasive potential, proliferation and metastatic spread. Esophageal cancer is differentiated in adenocarcinoma and squameous cell carcinoma of the esophagus. 4-methylumbelliferone (4MU) is an inhibitor of the hyaluronan synthases (HAS1-3) and is thought to have promising properties as an anticancer agent.

The aim of the present study was to investigate whether inhibition of HA-synthesis affects ESCC progression. We used a squameous cancer cell line (OSC1) expressing HAS3>HAS2>>>HAS1. These human OSC1 cells were xenografted into NMRI nu/nu mice and the effect on tumor progression of 4-MU and lentiviral knockdown of HA-synthase 3 (HAS3), the main HAS isoform in ESCC, was determined. Tumor progression was monitored by caliper measurements and at the end of the experimental period by flat panel volume CT. Subsequently tumors were investigated histologically with respect to HA content, cellular composition, proliferation (Ki67) and vascularisation (CD31).

During the course of 7 weeks 4-MU inhibited tumor progression; remodelling of the tumor into a differentiated tumor phenotype. Furthermore, inhibition of cell proliferation and vascularisation was observed. Lentiviral knockdown of HAS3 in human ESCC cells prior to xenografting pheno-copied the effects of 4-MU treatment with respect to histopathological remodelling, inhibition of proliferation and tumor progression. The vascularisation was not affected by lentiviral knockdown of HAS3 in human ESCC cells.

That leads to the conclusion, that systemic inhibition of HA synthesis and knockdown of tumor cell HAS3 are sufficient to inhibit ESCC progression and may therefore provide a target for novel approaches to ESCC therapy.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
4-ME	4-Methylesculetin
ampR	Ampicillin-Resistenz-Gen
BSA	Bovines Serumalbumin
Cre	Zyklische Rekombinase
Cy3	Carbocyanin 3
DNA, DNS	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli Bakterien
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fpVCT	<i>Flat panel Volume Computer Tomography</i>
GERD	Gastroösophageale Refluxerkrankung
h	Stunden
HA	Hyaluronsäure
HAbP	Hyaluronsäurebindeprotein
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HCL	Salzsäure
H.E.	Hämalaun-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus 1
HRP	Meerrettich-Peroxidase
INN	<i>International nonproprietary name</i> , Internationaler markenfreier Name
I $\alpha$ I	<i>Inter-<math>\alpha</math>-Trypsin-Inhibitor</i>
Lox P	<i>Locus of X-over P1</i> auf der Bakteriophage P1
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> , Lange endständige Wiederholung
min	Minuten
MMP	Matrix Metallo Proteinase
MOI	Multiplicity of Infektion, Verhältnis zwischen Viren und Zielzellen
mRNA	<i>Messenger-RNA</i> , Boten-RNS
ms	Millisekunde

MSF	Migration stimulierender Faktor
NMRI nu/nu	Nacktmäuse
OSC1	ösophageale Plattenepithelkarzinomzellen, Zelllinie
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
puroR	Puromycin-Resistenz-Gen
RhodX	Rhodamin X
RNA, RNS	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
SEM	Standart Abweichung
shHAS3	Lentivirus
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i> , kleine Haarnadel RNS
siRNA	<i>Small interference RNA</i> , kleine Interferenz RNS
TNM	Klassifikation maligner Tumore, T = Tumor, N= Lymphknoten, M= Metastasen
TSG-6	Tumor Nekrose Faktor stimuliertes Gen 6
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glukuryltransferase
UICC	International Union against cancer
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis Virus G-Protein
ZK	Zellkern

## 8 Literaturverzeichnis

- Albertsson, M. (2002):Chemoradiotherapy of esophageal cancer. *Acta Oncol* 41(2): 118-23.
- Baden, T., K. Yamamichi, et al. (2006):Sequential endoscopic findings and histological changes of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats. *Oncol Rep* 16(5): 965-70.
- Baumgartner, G., C. Gomar-Hoss, et al. (1998):The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors--experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy. *Cancer Lett* 131(1): 85-99.
- Baumgartner, G., C. Gomar-Höss, et al. (1998):The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors--experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy. *Cancer Lett* 131(1): 85-99.
- Baumhoer, D. and G. Ramadori (2005):[Esophageal carcinoma -- current status in diagnosis and therapy]. *Z Gastroenterol* 43(4): 399-409.
- Baumhoer, D. and G. Ramadori (2005):[Esophageal carcinoma -- current status in diagnosis and therapy]. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 43(4): 399-409.
- Bharadwaj, A. G., J. L. Kovar, et al. (2009):Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing. *Am J Pathol* 174(3): 1027-36.
- Bharadwaj, A. G., K. Rector, et al. (2007):Inducible hyaluronan production reveals differential effects on prostate tumor cell growth and tumor angiogenesis. *J Biol Chem* 282(28): 20561-72.
- Bourguignon, L. Y., E. Gilad, et al. (2007):Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent ovarian tumor cell growth and migration. *J Biol Chem* 282(27): 19426-41.
- Bray, F., R. Sankila, et al. (2002):Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 38(1): 99-166.
- Bucholtz, F. (2008):Principles of site-specific recombinase (SSR) technology. *J Vis Exp* (15): 718.
- Cancer, International Agency for Research on Cancer (1988): Alcohol drinking, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans 1988, Alcohol drinking 44: 153-250.
- Chhabra, E. S. and H. N. Higgs (2007):The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* 9(10): 1110-21.
- Dai, G., T. Freudenberger, et al. (2007):Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic Acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic Acid synthases. *Am J Pathol* 171(5): 1451-61.
- Dawsey, S. M., G. Q. Wang, et al. (1993):Squamous dysplasia and early esophageal cancer in the Linxian region of China: distinctive endoscopic lesions. *Gastroenterology* 105(5): 1333-40.
- Day, A. J. and G. D. Prestwich (2002):Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem* 277(7): 4585-8.
- Delmage, J. M., D. R. Powars, et al. (1986):The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid. *Ann Clin Lab Sci* 16(4): 303-10.
- Dolorgiet (1982, 2002, 2008): Fachinformation Cholspasmin ® forte 400mg. D. &CO.KG. Deutschland. Zulassungsnummer 2110.00.00.

- Edward, M., J. A. Quinn, et al. (2010):4-Methylumbelliferone inhibits tumour cell growth and the activation of stromal hyaluronan synthesis by melanoma cell-derived factors. *Br J Dermatol.* 162(6): 1224-32
- Eloubeidi, M. A., A. C. Mason, et al. (2003):Temporal trends (1973-1997) in survival of patients with esophageal adenocarcinoma in the United States: a glimmer of hope? *Am J Gastroenterol* 98(7): 1627-33.
- Entwistle, J., C. L. Hall, et al. (1996):HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton. *J Cell Biochem* 61(4): 569-77.
- Entwistle, J., S. Zhang, et al. (1995):Characterization of the murine gene encoding the hyaluronan receptor RHAMM. *Gene* 163(2): 233-8.
- Fam, H., J. T. Bryant, et al. (2007):Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology* 44(2): 59-74.
- Feinberg, R. N. and D. C. Beebe (1983):Hyaluronate in vasculogenesis. *Science* 220(4602): 1177-9.
- Fogh, J., J. M. Fogh, et al. (1977):One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59(1): 221-6.
- Formby, B. and R. Stern (2003):Lactate-sensitive response elements in genes involved in hyaluronan catabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 305(1): 203-8.
- Freiburg, T. (2001). Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Ösophaguskarzinoms. Germany. Leitlinie des Tumorzentrum Freiburg 2001
- Gebhardt, C., M. Averbeck, et al. (2010):Dermal hyaluronan is rapidly reduced by topical treatment with glucocorticoids. *J Invest Dermatol* 130(1): 141-9.
- Ghatak, S., S. Misra, et al. (2002):Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 277(41): 38013-20.
- Golshani, R., L. Lopez, et al. (2008):Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. *Cancer Res* 68(2): 483-91.
- Greenlee, R. T., M. B. Hill-Harmon, et al. (2001):Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 51(1): 15-36.
- Hajime, M., Y. Shuichi, et al. (2007):Inhibitory effect of 4-methylesculetin on hyaluronan synthesis slows the development of human pancreatic cancer in vitro and in nude mice. *Int J Cancer* 120(12): 2704-9.
- Hall, C. L. and E. A. Turley (1995):Hyaluronan: RHAMM mediated cell locomotion and signaling in tumorigenesis. *J Neurooncol* 26(3): 221-9.
- Hall, C. L., C. Wang, et al. (1994):Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J Cell Biol* 126(2): 575-88.
- Hardwick, C., K. Hoare, et al. (1992):Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol* 117(6): 1343-50.
- Haynes, B. F., H. X. Liao, et al. (1991):The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells* 3(9): 347-50.
- Haynes, B. F., M. J. Telen, et al. (1989):CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 10(12): 423-8.
- Herold, G. H., Jan; Heintges, Tobias; Sauer, Wolfgang (2009). *Gastroenterologie. Innere Medizin*. G. Herold. Köln: 412-413.
- Holmes, R. S. and T. L. Vaughan (2007):Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer. *Semin Radiat Oncol* 17(1): 2-9.

- Horai, S., R. Kondo, et al. (1991):Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 333(1268): 409-16; discussion 416-7.
- Howel-Evans, W., C. R. Mc, et al. (1958):Carcinoma of the oesophagus with keratosis palmaris et plantaris (tylosis): a study of two families. *Q J Med* 27(107): 413-29.
- Huang, B., C. Q. Li, et al. (2010):Collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer scaffold for nucleus pulposus tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 92(2): 322-31.
- Inkinen, R. I., M. J. Lammi, et al. (1999):Hyaluronan distribution in the human and canine intervertebral disc and cartilage endplate. *Histochem J* 31(9): 579-87.
- Itano, N. and K. Kimata (2002):Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life* 54(4): 195-9.
- Itano, N., L. Zhuo, et al. (2008):Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. *Cancer Sci* 99(9): 1720-5.
- Jokela, T. A., M. Jauhiainen, et al. (2008):Mannose inhibits hyaluronan synthesis by down-regulation of the cellular pool of UDP-N-acetylhexosamines. *J Biol Chem* 283(12): 7666-73.
- Kakizaki, I., K. Kojima, et al. (2004):A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem* 279(32): 33281-9.
- Kakizaki, I., K. Takagaki, et al. (2002):Inhibition of hyaluronan synthesis in *Streptococcus equi* FM100 by 4-methylumbelliferone. *Eur J Biochem* 269(20): 5066-75.
- Kim, S., H. Takahashi, et al. (2009):Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457(7225): 102-6.
- Knudson, C. B. and W. Knudson (1993):Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J* 7(13): 1233-41.
- Kosunen, A., K. Ropponen, et al. (2004):Reduced expression of hyaluronan is a strong indicator of poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 40(3): 257-63.
- Kudo, D., A. Kon, et al. (2004):Effect of a hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, on B16F-10 melanoma cell adhesion and locomotion. *Biochem Biophys Res Commun* 321(4): 783-7.
- Kultti, A., S. Pasonen-Seppanen, et al. (2009):4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. *Exp Cell Res* 315(11): 1914-23.
- Leeuwenburgh, I., M. M. Gerrits, et al. (2010):Expression of p53 as predictor for the development of esophageal cancer in achalasia patients. *Dis Esophagus*. 23(6): 506-11.
- Lesley, J., V. C. Hascall, et al. (2000):Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem* 275(35): 26967-75.
- Li, C. Q., B. Huang, et al. (2010):Construction of collagen II/hyaluronate/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer scaffold for nucleus pulposus tissue engineering and preliminary analysis of its physico-chemical properties and biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* 21(2): 741-51.
- Li, S. Y., Y. Li, et al. (2009):[Meta analysis on etiological relationship between human papillomavirus and esophageal carcinoma]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 23(2): 85-7.

- Luquita, A., L. Urli, et al. (2010):In vitro and ex vivo effect of hyaluronic acid on erythrocyte flow properties. *J Biomed Sci* 17(1): 8.
- McBride, W. H. and J. B. Bard (1979):Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytolysis. *J Exp Med* 149(2): 507-15.
- Melrose, J., M. Tammi, et al. (2002):Visualisation of hyaluronan and hyaluronan-binding proteins within ovine vertebral cartilages using biotinylated aggrecan G1-link complex and biotinylated hyaluronan oligosaccharides. *Histochem Cell Biol* 117(4): 327-33.
- Merzak, A., S. Koocheckpour, et al. (1994):CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Res* 54(15): 3988-92.
- Meyer K., P. J. (1934):The polysaccharide of the vitreous humour *J. Biol Chem.* 107: 629-624.
- Missbach-Guentner, J., C. Dullin, et al. (2008):Morphologic changes of mammary carcinomas in mice over time as monitored by flat-panel detector volume computed tomography. *Neoplasia* 10(7): 663-73.
- Morohashi, H., A. Kon, et al. (2006):Study of hyaluronan synthase inhibitor, 4-methylumbelliferone derivatives on human pancreatic cancer cell (KP1-NL). *Biochem Biophys Res Commun* 345(4): 1454-9.
- Nakamura, R., H. Kuwabara, et al. (2007):Suppression of matrix metalloproteinase-9 by 4-methylumbelliferone. *Cell Biol Int* 31(9): 1022-6.
- Nakamura, T., M. Funahashi, et al. (1997):Effect of 4-methylumbelliferone on cell-free synthesis of hyaluronic acid. *Biochem Mol Biol Int* 43(2): 263-8.
- Nakamura, T., T. Ishikawa, et al. (2002):4-Methylumbelliferone induces the expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 298(5): 646-50.
- Nakamura, T., K. Takagaki, et al. (1995):Hyaluronic-acid-deficient extracellular matrix induced by addition of 4-methylumbelliferone to the medium of cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 208(2): 470-5.
- Nakazawa, H., S. Yoshihara, et al. (2006):4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 57(2): 165-70.
- Nesti, L. J., W. J. Li, et al. (2008):Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid-nanofibrous scaffold (HANFS) amalgam. *Tissue Eng Part A* 14(9): 1527-37.
- Ohno, S., C. Ijuin, et al. (2002):Expression and activity of hyaluronidase in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 73(11): 1331-7.
- Ozawa, S., M. Ueda, et al. (1987):High incidence of EGF receptor hyperproduction in esophageal squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer* 39(3): 333-7.
- Palyi-Krek, Z., M. Barok, et al. (2007):Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer* 43(16): 2423-33.
- Pasonen-Seppanen, S., S. Karvinen, et al. (2003):EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 120(6): 1038-44.
- Pasonen-Seppanen, S. M., E. V. Maytin, et al. (2008):All-trans retinoic acid-induced hyaluronan production and hyperplasia are partly mediated by EGFR signaling in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 128(4): 797-807.
- Rilla, K., S. Pasonen-Seppanen, et al. (2004):The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal



- hyperproliferation induced by epidermal growth factor. *J Invest Dermatol* 123(4): 708-14.
- Ropponen, K. M., M. J. Eskelinen, et al. (1997):Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 182(3): 318-24.
- Rudrabhatla, S. R., C. L. Mahaffey, et al. (2006):Tumor microenvironment modulates hyaluronan expression: the lactate effect. *J Invest Dermatol* 126(6): 1378-87.
- Rygaard, J. and C. O. Povlsen (1969):Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 77(4): 758-60.
- Sarbia, M., N. Bosing, et al. (1997):Characterization of two newly established cell lines derived from squamous cell carcinomas of the oesophagus. *Anticancer Res* 17(3C): 2185-92.
- Sattar, A., P. Rooney, et al. (1994):Application of angiogenic oligosaccharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin. *J Invest Dermatol* 103(4): 576-9.
- Sauer, B. (1987):Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7(6): 2087-96.
- Sauer, B. (1998):Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14(4): 381-92.
- Schulz, T., U. Schumacher, et al. (2007):Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP. *J Biol Chem* 282(29): 20999-1004.
- Shimada, Y., M. Imamura, et al. (1999):Prognostic factors of oesophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. *Br J Cancer* 80(8): 1281-8.
- Shine, I. and P. R. Allison (1966):Carcinoma of the oesophagus with tylosis (keratosis palmaris et plantaris). *Lancet* 1(7444): 951-3.
- Simpson, M. A. (2006):Concurrent expression of hyaluronan biosynthetic and processing enzymes promotes growth and vascularization of prostate tumors in mice. *Am J Pathol* 169(1): 247-57.
- Slevin, M., J. Krupinski, et al. (2007):Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol* 26(1): 58-68.
- Slevin, M., S. Kumar, et al. (2002):Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J Biol Chem* 277(43): 41046-59.
- Stern, R. (2004):Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol* 83(7): 317-25.
- Stern, R., A. A. Asari, et al. (2006):Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 85(8): 699-715.
- Stern, R., S. Shuster, et al. (2002):Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res* 276(1): 24-31.
- Sugahara, K. N., T. Murai, et al. (2003):Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem* 278(34): 32259-65.
- Sussmann, M., M. Sarbia, et al. (2004):Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. *Circ Res* 94(5): 592-600.
- Szumilo, J., F. Burdan, et al. (2009):[Cyclooxygenase inhibitors in chemoprevention and treatment of esophageal squamous cell carcinoma]. *Pol Merkur Lekarski* 27(161): 408-12.

- Tammi, R. H., A. Kultti, et al. (2008):Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol* 18(4): 288-95.
- Taylor, K. R., J. M. Trowbridge, et al. (2004):Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem* 279(17): 17079-84.
- Termeer, C., F. Benedix, et al. (2002):Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 195(1): 99-111.
- Termeer, C. C., J. Hennies, et al. (2000):Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol* 165(4): 1863-70.
- Thomas, N. K. and T. J. Brown (2010):ABC transporters do not contribute to extracellular translocation of hyaluronan in human breast cancer in vitro. *Exp Cell Res*. 316(7): 1241-53.
- Tofuku, K., M. Yokouchi, et al. (2006):HAS3-related hyaluronan enhances biological activities necessary for metastasis of osteosarcoma cells. *Int J Oncol* 29(1): 175-83.
- Tolg, C., S. R. Hamilton, et al. (2010):RHAMM promotes interphase microtubule instability and mitotic spindle integrity through MEK1/ERK1/2 activity. *J Biol Chem* 285(34): 26461-74.
- Toole, B. P. (2002):Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology* 12(3): 37R-42R.
- Toole, B. P. and V. C. Hascall (2002):Hyaluronan and tumor growth. *Am J Pathol* 161(3): 745-7.
- Turley, E. A., P. W. Noble, et al. (2002):Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 277(7): 4589-92.
- Twarock, S., K. Rock, et al. (2009):Synthesis of hyaluronan in oesophageal cancer cells is uncoupled from the prostaglandin-cAMP pathway. *Br J Pharmacol* 157(2): 234-43.
- Twarock, S., M. I. Tammi, et al. (2010):Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells. *J Biol Chem* 285(30): 23276-84.
- UICC (2009): Neue TNM-Klassifikation der Ösophaguskarzinome 2009/2010, 7. Auflage.
- Underhill, C. B., S. J. Green, et al. (1987):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* 262(27): 13142-6.
- Vigetti, D., M. Rizzi, et al. (2009):The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells. *Glycobiology* 19(5): 537-46.
- Vizcaino, A. P., V. Moreno, et al. (2002):Time trends incidence of both major histologic types of esophageal carcinomas in selected countries, 1973-1995. *Int J Cancer* 99(6): 860-8.
- Wang, C., M. Tammi, et al. (1996):Hyaluronan distribution in the normal epithelium of esophagus, stomach, and colon and their cancers. *Am J Pathol* 148(6): 1861-9.
- Ward, J. A., L. Huang, et al. (2003):Perturbation of hyaluronan interactions inhibits malignant properties of glioma cells. *Am J Pathol* 162(5): 1403-9.
- West, D. C., I. N. Hampson, et al. (1985):Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 228(4705): 1324-6.
- Wu, M. T., Y. C. Lee, et al. (2001):Risk of betel chewing for oesophageal cancer in Taiwan. *Br J Cancer* 85(5): 658-60.

- Xu, H., T. Ito, et al. (2002):Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J Biol Chem* 277(19): 17308-14.
- Yoshihara, S., A. Kon, et al. (2005):A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. *FEBS Lett* 579(12): 2722-6.
- Zhang, B., H. Q. Xia, et al. (2001):A highly efficient and consistent method for harvesting large volumes of high-titre lentiviral vectors. *Gene Ther* 8(22): 1745-51.
- Znaor, A., P. Brennan, et al. (2003):Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer* 105(5): 681-6.

## **9 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 Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Warendorf, den 15.05.2013

Eva Rieth, geb. Poscher

## 10 Danksagung

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. rer. nat. J.W. Fischer für die Vergabe des äußerst interessanten Themas und die freundliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Sören Twarock danke ich herzlich für die stets freundliche und konstruktive Betreuung meiner Arbeit, sowie für die vielen anregenden Diskussionen über Ideen, Aussagen und Ergebnisse. Besonders möchte ich mich für die technische Unterstützung bedanken, die mich vor einigen „Stürmen und Schiffsbrüchen“ bei der Anfertigung meiner Dissertationsschrift bewahrt hat.

Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Homey danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Während der gesamten Anfertigung dieser Arbeit hat mich stets der Gedanke an meinen verstorbenen Patenonkel begleitet. Ich hoffe mit dieser Arbeit ein kleines Puzzlestück in der Forschung und Therapie dieser Erkrankung beigetragen zu haben! Daher gilt ein besonderer Dank meiner Oma, meiner Mutter und seiner Familie, die mich darin bestärkt haben, dieses Thema auszuwählen.

Besonders danke ich meinem Ehemann Kai Robert Rieth, meinen Eltern und meinem Bruder für ihre Unterstützung, Geduld, sowie für zahlreiche tröstende und so manch aufmunternde Worte zur richtigen Zeit.

Frau Annika Zimmermann und Frau Peggy Marra-Mann danke ich für die experimentelle Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Frau Martina Rosen danke ich für die vielen gemeinsamen Stunden und Diskussionen, die wir gemeinsam verbracht haben.

Bei den anderen Kollegen aus der Arbeitsgruppe und den restlichen Mitarbeitern des Institutes möchte ich mich für die sehr nette Arbeitsatmosphäre am Institut bedanken, die sicherlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

**„Das Ganze ist mehr, als  
die Summe seiner Teile“**

**Aristoteles**

**M**einen Eltern

**M**einem Patenonkel

**M**einer Familie

## 11 Lebenslauf

Persönliches	
<b>Name</b>	<b>Eva Poscher</b>
Adresse	Hohe Strasse 8, 48231 Warendorf
Geburtstag/ -Ort	21.05.1986, Willich
Familienstand	Verheiratet
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Ausbildung	
Seit Januar 2012	Assistenzärztin für „Innere Medizin“ am Josephs Hospital Warendorf, NRW
November 2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, NRW
WS 2005 - WS 2011	Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung September 2007
1996 - 2005	Maria-Sibylla-Merian Gymnasium, Krefeld
1992 - 1996	Grundschule Wimmersweg, Krefeld
Praktika	
09/2010 - 07/2011	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09/2009	Famulatur Gynäkologie und Geburtshilfe am Universitäts Klinikum Graz, Österreich
03/2009 und 08/2009	Famulaturen Innere Medizin/ Ambulanz der Inneren Medizin am Katharinen Hospital Willich, Dr. W. Ormann
04/2009	Famulatur Gynäkologie und Geburtshilfe am St. Josefshospital, Krefeld
Wissenschaftliche Tätigkeiten	
04/2011	Veröffentlichung im Rahmen der Dissertation <i>“Inhibition of Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Progression by in vivo Targeting of Hyaluronan Synthesis”</i> , Twarock et al., Molecular Cancer 2011
Seit 02/2008	Medizinische Doktorandin am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, HHU Düsseldorf, Prof. Dr. J.W. Fischer
10/2009	Klinisches Wahlfach “Molekulare Onkologie in der Chirurgie”, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf
02/2007	Experimentelles Laborpraktikum, Neurobiochemisches Forschungslabor, LVR Kliniken Düsseldorf

