

# **Untersuchungen zur Rolle von Hyaluronsäure und Hyaluronsäuresynthase-Isoformen im Kontext des Ösophaguskarzinoms**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Inga Kretschmer**  
aus Mettmann

Düsseldorf, Februar 2015

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

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

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

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. April 2015

**Meiner Familie**

**A smooth sea never made a skilled sailor.**  
Englisches Sprichwort

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Einführung	1
1.2 Maligne Neoplasien	1
1.3 Fibroblasten im Tumorstroma	2
1.3.1 Herkunft tumorassoziierter Fibroblasten	2
1.3.2 Einfluss tumorassoziierter Fibroblasten auf die Tumورprogression	3
1.3.3 Immunmodulierende Eigenschaften tumorassoziierter Fibroblasten	4
1.3.4 Umbau der extrazellulären Matrix durch tumorassozierte Fibroblasten	4
1.4 Hyaluronsäure	5
1.4.1 Struktur der Hyaluronsäure	5
1.4.2 Einfluss der Hyaluronsäure auf das Tumورwachstum	6
1.4.3 Bedeutung der Hyaluronsäure für Zellmotilität und Metastasierung	7
1.4.4 Hyaluronsäure und Angiogenese	7
1.4.5 Hyaluronsäure und epithelial-mesenchymale Transition	7
1.4.6 Einfluss der Hyaluronsäure auf den Myofibroblasten-Phänotyp	8
1.4.7 Immunmodulierende Wirkung von Hyaluronsäure	8
1.4.8 Hyaluronsäure im Tumorgewebe	9
1.5 Hyaluronsäuresynthesen	11
1.5.1 Hyaluronsäuresynthese	11
1.5.2 Struktur der Hyaluronsäuresynthesen	11
1.5.3 Regulation der Hyaluronsäuresynthese	11
1.5.4 Isoformen der Hyaluronsäuresynthesen	12
1.6 Hyaluronsäure in der Tumorthherapie	13
1.6.1 Wirkung von Hyaluronsäure-Oligosacchariden	13
1.6.2 Hyaluronidasen in der Tumorthherapie	13
1.6.3 anti-CD44-gerichtete Tumorthherapie	14
1.6.4 4-Methylumbelliferon	14
1.7 Ösophaguskarzinom	16
1.8 Erlotinib zur Behandlung des Ösophaguskarzinoms	16
1.9 Zielsetzung	18
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Zellversuche	19
2.1.1 Isolation primärer muriner Fibroblasten	19
2.1.1.1 Isolation von murinen Hautfibroblasten	19
2.1.1.2 Isolation tumorassoziierter Fibroblasten	20
2.1.2 Direkte und indirekte Ko-Kultur	21
2.1.3 Transfektion	21
2.1.3.1 Transfektion von KYSE-410-Zellen und Hautfibroblasten mit si RNA	21
2.1.3.2 Transfektion von COS-1- und HEK293-Zellen mit Hyaluronsäuresynthase-codierenden Plasmiden	22
2.1.4 Behandlung der Zellen mit einem MEK-1-Inhibitor	23
2.1.5 Bestimmung der Proliferation in Ko-Kultur	23
2.1.5.1 Quantifizierungen der KYSE-410-Zellzahl mittels Durchflusszytometrie	23

# Inhaltsverzeichnis

2.1.5.2 Bestimmung der Fibroblasten-Proliferation in der Durchflusszytometrie	24
2.1.6 Behandlung mit Erlotinib und 4-Methylumbelliferon in 2D und 3D <i>in vitro</i> -Modellen	24
2.1.7 Ermittlung des Kombinations-Index	25
2.1.8 Zellzyklusanalyse mit Propidium-Iodid in der Durchflusszytometrie	26
2.1.9 [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Inkorporations-Analyse	26
2.2 Mikroskopie	27
2.2.1 Immunzyto- und Immunhistochemie	27
2.2.1.1 Fluoreszenzfärbung von $\beta$ -Catenin und Zytokeratin-18 auf Zellen	27
2.2.1.2 Fluoreszenzfärbung von Hyaluronsäure und Zytokeratin-18 auf Zellen	27
2.2.1.3 Fluoreszenzfärbung von Hyaluronsäure, Zytokeratin-18 und $\alpha$ -Glattmuskelaktin auf Tumorgewebe	28
2.2.2 Perizellulärer Hyaluronsäuremantel von transfizierten COS-1-Zellen	28
2.2.3 Lokalisierung der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b	28
2.2.4 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	29
2.2.5 Zeitraffer-Mikroskopie zur Bestimmung der Zell-Migration	29
2.3 Hyaluronsäure- und Proteinanalytik	30
2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate	30
2.3.2 Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration im Mediumsüberstand	30
2.3.3 Bestimmung der CCL5- und CCL11-Konzentration im Mediumsüberstand	30
2.3.4 Western-Blot	31
2.3.5 Co-Immunpräzipitation	32
2.3.6 Protein-Quervernetzung	32
2.4 Genexpressionsanalyse	33
2.4.1 RNA-Isolation und reverse Transkription	33
2.4.2 Quantitative <i>Realtime</i> -PCR	33
2.5 Statistische Auswertung	34
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1 Charakterisierung der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b	35
3.1.1 Hyaluronsäuresynthase von Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform a und b in COS-1-Zellen	35
3.1.2 Stimulation des perizellulären Hyaluronsäuremantels durch Glucosamin	37
3.1.3 Oligomerisierung der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b	38
3.1.4 Homo- und Heterooligomerisierung der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b	40
3.1.5 Einfluss der Heterooligomerisierung auf die Hyaluronsäure-Produktion	42
3.2 Untersuchungen zur Interaktion von KYSE-410-Zellen mit Fibroblasten	46
3.2.1 Hyaluronsäure in KYSE-Xenografttumoren	46
3.2.2 Hyaluronsäure in direkten Ko-Kulturen von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten	46
3.2.3 Regulation der Hyaluronsäuresynthase 2-Induktion in Fibroblasten	48
3.2.4 Untersuchungen zum Einfluss der von Fibroblasten exprimierten Hyaluronsäuresynthase 2 auf die KYSE-410-Zellen in Ko-Kultur	51
3.2.5 Einfluss der Hyaluronsäuresynthase 2-mRNA-Induktion auf die Fibroblasten in Ko-Kultur	53
3.2.6 Chemokinexpression von Fibroblasten in Ko-Kultur	54
3.2.7 Einfluss der KYSE-410-Zellen auf tumorassoziierte Fibroblasten in Ko-Kulturen	56
3.2.8 Untersuchungen zum Einfluss tumorassoziiierter Fibroblasten auf die KYSE-410-Zellen in Ko-Kultur	58
3.3 Wirksamkeit der Kombination aus Hyaluronsäure-Synthase-Hemmung und Erlotinib in KYSE-410-Zellen	61
3.3.1 Zellzahl nach der Behandlung mit Erlotinib und gleichzeitiger Hemmung von Hyaluronsäure-Signalwegen	61
3.3.2 Synergistische Effekte der Kombination aus Erlotinib und 4-Methylumbelliferon	63
3.3.3 Anti-proliferative Effekte von Erlotinib und 4-Methylumbelliferon	65
3.3.4 Die Rolle möglicher involvierter Signalwege	67
3.3.5 Migration unter Behandlung mit Erlotinib und 4-Methylumbelliferon	68
3.3.6 Einfluss des Hyaluronsäure-Systems auf die Apoptose unter Behandlung mit Erlotinib in einer hohen Konzentration	68
3.3.7 Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung in einem 3D-Zellkultur-Modell	69

# Inhaltsverzeichnis

<b>4 Diskussion</b>	<b>72</b>
4.1 Eigenschaften der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b	72
4.2 Interaktion von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten	75
4.2.1 Hyaluronsäuresynthase 2-Induktion in Fibroblasten in direkter Ko-Kultur	75
4.2.1.1 An der Hyaluronsäuresynthase 2-Induktion beteiligte Signalwege	75
4.2.1.2 Einfluss des direkten Zell-Zell-Kontakts auf die Induktion der Hyaluronsäuresynthase 2	78
4.2.1.3 Mögliche Rolle von $\beta$ -Catenin an Zell-Zell-Kontakten von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten	78
4.2.2 Veränderung der Zell-Phänotypen durch die Ko-Kultur	79
4.2.2.1 Untersuchungen zur epithelial-mesenchymalen Transition von KYSE-410-Zellen in Ko-Kultur	79
4.2.2.2 Untersuchungen zur Proliferation von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten in Ko-Kultur	81
4.2.2.3 Untersuchungen zum Einfluss der Hyaluronsäuresynthase 2 auf die Migration von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten	83
4.2.2.4 Einfluss der Hyaluronsäuresynthase 2 auf den Myofibroblasten-Phänotyp	84
4.2.3 Modulation von Chemokinen in der Ko-Kultur	85
4.2.3.1 Induktion von CCL5	85
4.2.3.2 Reduktion von CCL11	88
4.2.4 Limitierung und Ausblick	89
4.3 Kombinationsbehandlung von KYSE-410-Zellen mit Erlotinib und 4-Methylumbelliferon	91
4.3.1 Wirksamkeit von Erlotinib in KYSE-410-Zellen	91
4.3.2 Wirksamkeit von 4-Methylumbelliferon und Hemmung des Hyaluronsäure-Signalwegs in KYSE-410-Zellen	91
4.3.3 Mögliche Mechanismen der synergistischen Wirkung von 4-Methylumbelliferon und Erlotinib	92
4.3.4 Limitierung und Ausblick	93
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>94</b>
<b>6 Summary</b>	<b>95</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>Appendix</b>	<b>119</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>132</b>
Originalarbeiten	132
Kongressbeiträge	133
<b>Danksagung</b>	<b>134</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>135</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Struktur der Hyaluronsäure. ....	5
Abbildung 2. Hyaluronsäuresynthase 3-Isoformen a und b. ....	13
Abbildung 3. Struktur von 4-Methylumbelliferon. ....	15
Abbildung 4. Struktur von Erlotinib. ....	17
Abbildung 5. Einsätze für die indirekte Ko-Kultur. ....	21
Abbildung 6. Hyaluronsäuresynthase in Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform-transfizierten COS-1-Zellen. ....	36
Abbildung 7. Lokalisierung von Dendra2-Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b in COS-1-Zellen. ....	37
Abbildung 8. Perizellulärer Hyaluronsäuremantel in Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b-transfizierten COS-1-Zellen nach Glucosamin-Stimulation. ....	38
Abbildung 9. Oligomerisierung der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b. ....	39
Abbildung 10. EGFP- und mCherry-Fluoreszenz vor- und nach dem Bleichvorgang und Darstellung der FRET-Effizienz. ....	40
Abbildung 11. EGFP- und mCherry-Fluoreszenz vor- und nach dem Bleichvorgang und Darstellung der FRET-Effizienz. ....	41
Abbildung 12. Hyaluronsäuresynthase in Hyaluronsäuresynthase 2- und -3-Isoform b exprimierenden COS-1-Zellen. ....	43
Abbildung 13. Hyaluronsäuresynthase in Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform a und b exprimierenden COS-1-Zellen. ....	44
Abbildung 14. Hyaluronsäure in Xenografttumoren. ....	46
Abbildung 15. Hyaluronsäuresynthase und Hyaluronsäuresynthase-mRNA-Expression in direkter Ko-Kultur. ....	47
Abbildung 16. Hyaluronsäuresynthase-mRNA-Expression in indirekter Ko-Kultur. ....	48
Abbildung 17. Beteiligung von $\beta$ -Catenin/LEF1-Signalwegen an der Hyaluronsäuresynthase 2-Induktion. ....	49
Abbildung 18. Einfluss von MEK1-Inhibition und Basigin (Bsg)- <i>knockdown</i> auf die Hyaluronsäuresynthase 2-Induktion. ....	50
Abbildung 19. Einfluss der Hyaluronsäuresynthase 2-Expression in Fibroblasten auf den KYSE-Phänotyp in Ko-Kultur. ....	52
Abbildung 20. Einfluss der Hyaluronsäuresynthase 2 auf den Fibroblasten-Phänotyp in Ko-Kultur. ...	53
Abbildung 21. CCL5 in direkter Ko-Kultur. ....	54
Abbildung 22. CCL11 in direkter Ko-Kultur. ....	55
Abbildung 23. Eigenschaften tumorassoziierter Fibroblasten in direkter Ko-Kultur. ....	57
Abbildung 24. mRNA-Expression von EMT-Markern, Proliferation und Migration in KYSE-410-Zellen in Ko-Kulturen mit tumorassozierten Fibroblasten. ....	59
Abbildung 25. Wirkung von Erlotinib in Kombination mit einer Hemmung von Hyaluronsäure-Signalwegen auf die KYSE-410-Zellzahl. ....	62
Abbildung 26. Synergistische Wirkung von Erlotinib und 4-Methylumbelliferon auf die KYSE-Zellzahl. ....	64
Abbildung 27. Einfluss der Kombination von Erlotinib und 4-Methylumbelliferon auf die Proliferation. ....	66
Abbildung 28. ERK- und AKT-Phosphorylierung unter Behandlung mit Erlotinib und 4-Methylumbelliferon. ....	67
Abbildung 29. Migration von KYSE-410-Zellen unter Behandlung mit Erlotinib und 4-Methylumbelliferon. ....	68
Abbildung 30. PARP-Spaltung nach <i>knockdown</i> von Hyaluronsäuresynthasen und Hyaluronsäurerezeptoren und Behandlung mit Erlotinib in hoher Dosierung. ....	69
Abbildung 31. Erlotinib und 4-Methylumbelliferon in der 3D-Zellkultur. ....	71
Abbildung 32. Kanonische Wnt-Signaltransduktion. ....	77
Abbildung 33. Plasmide codierend für EGFP- und mCherry- HAS3b-Fusionsproteine. ....	125
Abbildung 34. Untersuchungen zur epithelial-mesenchymalen Transition von KYSE-410-Zellen nach 48-stündiger Ko-Kultur. ....	131

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Vorhersagewert der Hyaluronsäure-Menge in malignen Tumoren .....	10
Tabelle 2. Transfektionsbedingungen. ....	23
Tabelle 3. Hyaluronsäuresynthase-Isoformen, -Transkriptionvarianten und <i>antisense</i> -RNA .....	120
Tabelle 4. Erlotinib in der Therapie des Ösophaguskarzinoms.....	121
Tabelle 5. Zusammensetzung der Nährmedien in der Zellkultur. ....	124
Tabelle 6. Verwendete si RNA. ....	126
Tabelle 7. Zusammensetzung der Gele für die Western-Blot-Analyse. ....	127
Tabelle 8. Zusammensetzung der Lysepuffer. ....	127
Tabelle 9. Primärantikörper. ....	128
Tabelle 10. Sekundärantikörper. ....	128
Tabelle 11. Pufferzusammensetzung. ....	129
Tabelle 12. Primersequenzen für speziesspezifische qPCR muriner Gene. ....	129
Tabelle 13. Primersequenzen für speziesspezifische qPCR humaner Gene. ....	130
Tabelle 14. Primersequenzen zur Überprüfung des <i>knockdowns</i> humaner Gene durch qPCR.....	130

## Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
ABC	ATP-bindende Kasette
AKT	Proteinkinase B
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
$\alpha$ SMA	$\alpha$ -Glattmuskelaktin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsg	Basigin, Emmprin, CD147
CAF	<i>Cancer associated fibroblasts</i> , tumorassoziierte Fibroblasten
CaMKII	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	<i>Chemokine (C-C motif) receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDH1	Cadherin 1, Typ 1, E-cadherin (epithelial)
cDNA	Komplementäre DNA
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CK-18	Zytokeratin-18
c-Met	<i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
COS-1	<i>Siman virus-40 transformierte Nierenzellen aus Cercopithecus aethiops</i>
COX2	Cyclooxygenase-2
Cox Multi	Cox's multivariate Überlebensanalyse
cpm	<i>Counts per minute</i>
CREB1	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
CXCR	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EAC	Adenokarzinom des Ösophagus
ED	Effektive Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	EGF Rezeptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EndMT	Endothelial-mesenchymale Transition
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB2	<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
Erlo	Erlotinib
ESCC	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus
EYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fa	<i>Fraction affected</i>
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FAP	Fibroblasten-Aktivierungs Protein
FCS	Fetales bovines Serum

## Abkürzungsverzeichnis

FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FN1	Fibronektin
FRET	Förster-/Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	Vorwärtsstreulicht
FSP1	Fibroblasten-spezifisches Protein 1
G0	<i>Gap 0</i>
G1	<i>Gap 1</i>
G2/M	<i>Gap 2/ Mitose</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GlcUA	Glucuronsäure
GTPase	Guanosintriphosphat Hydrolase
HA	Hyaluronsäure
HABP	HA-bindendes Protein
HARE	HA-Rezeptor für Endozytose, Stabilin 2
HAS	HA-Synthase
HEK	<i>Human embryonic kidney cells</i>
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
Hyal	Hyaluronidase
ICC	Immunzytochemie
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KD	<i>Knockdown</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
KYSE	Humane ESCC-Zelllinie
LEF1	<i>Lymphoid enhancer binding factor 1</i>
LYVE1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
m	Masse
M	mol/L
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCF7	Humane Mammakarzinom-Zelllinie
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor-cells</i>
MEK1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MKI67	Marker der Proliferation Ki-67
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFκB	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NMRI <i>nude</i>	Naval Medical Research Institute Nacktmaus-Modell
n.d.	Unterhalb der Detektionsgrenze
n.s.	Nicht signifikant
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OPN	Osteopontin, <i>secreted phosphoprotein 1</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PD98059	2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on
PDGF	Plättchen-stämmiger Wachstumsfaktor
PDGFR	PDGF-Rezeptor
PEG	Polyethylenglycol

## Abkürzungsverzeichnis

PEI	Polyethylenimin
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-kinase
qPCR	Quantitative <i>Realtime</i> -Polymerase-Kettenreaktion
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RHAMM	<i>hyaluronan-mediated motility receptor (HMMR)</i>
RhoA	<i>Ras homolog family member A</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of interest</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCC	Seitwärtsstreulicht
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SF	Hautfibroblasten
sh	<i>Small hairpin</i>
si	<i>Small interfering</i>
SNAI1	<i>Snail family zinc finger 1</i>
Smad	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
Sp	<i>Specificity protein</i>
S-Phase	Synthesephase
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TBS/T	Tris-buffered saline/ Tween®20
TCF	T-Zell Faktor
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$
TGFR1	TGF-Rezeptor 1
Th	T-Helfer
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TP53	Tumor Protein p53
Treg	Regulatorische T-Zellen
TSG6	<i>Tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene-6</i>
UDP	Uridindiphosphat
UniV	Univariate Analyse
V	Volumen
VEGF-A	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WB	Western-Blot
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>
ZEB1	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Maligne Neoplasien waren im Jahr 2013 die zweithäufigste Todesursache in Deutschland [1]. Bösartige Tumoren des Ösophagus standen weltweit an sechster Stelle der tumorbedingten Todesfälle. Sie sind mit einer schlechten Prognose assoziiert [2]. Daher ist es von Interesse, geeignete neue therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren. Fokus dieser Arbeit ist, die Hyaluronsäure (HA), ein Molekül der extrazellulären Matrix (EZM), bezüglich ihrer Rolle im Ösophaguskarzinom zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Teile, die unterschiedliche Aspekte zur Rolle der HA und HA-Synthase (HAS)-Isoformen beleuchtet. Zunächst wird eine Splicevariante der HAS3 charakterisiert, die in Adenokarzinomen des Ösophagus stärker exprimiert wurde als in gesundem Gewebe [3]. Anschließend wird die Rolle der HA bei der Interaktion von Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus mit Fibroblasten dargestellt. Der letzte Teil beinhaltet *in vitro*-Untersuchungen zur Therapie des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus (*esophageal squamous cell carcinoma*, ESCC) unter Verwendung des HA-Synthese-Inhibitors 4-Methylumbelliferon (4-MU) in der Kombination mit Erlotinib, einem *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor.

Einleitend werden grundlegende Charakteristika maligner Neoplasien beschrieben und insbesondere wird auf die Rolle tumorassoziierter Fibroblasten (*cancer-associated fibroblasts*, CAF) eingegangen, die unter anderem für den Umbau der EZM verantwortlich sind. Anschließend werden Hintergründe zu HA, ihrer Synthesen und ihre mögliche Rolle in der Tumortherapie dargelegt. Außerdem werden die malignen Neoplasien des Ösophagus sowie Ergebnisse aus Studien, in denen Erlotinib zur Therapie des Ösophaguskarzinoms angewendet wurde, vorgestellt.

## 1.2 Maligne Neoplasien

Maligne Tumore sind komplexe Gewebe aus neoplastischen Zellen und unterschiedlichen lokalen oder rekrutierten Zellen. In Karzinomen ist das Tumorparenchym vom Tumorstroma abgegrenzt. Das Parenchym wird aus neoplastischen, epithelialen Zellen gebildet während das Stroma aus Endothelzellen, Perizyten, Adipozyten und CAF besteht. Außerdem befinden sich unterschiedliche Arten von Immunzellen im Tumor [4, 5]. Maligne Tumore sind organähnliche Strukturen und zeichnen sich durch chronische Proliferation und zum Teil

## 1 Einleitung

durch Dissemination aus [6]. Durch genomische Instabilität und Mutationen können normale Zellen schrittweise Merkmale ausbilden, um maligne Tumore zu bilden und aufrecht zu erhalten. Im Gegensatz zu normalen Zellen erhalten maligne Tumorzellen die proliferative Signalübertragung aufrecht und sind unbegrenzt teilungsfähig. Tumorzellen können dem Zelltod, Wachstums-Suppressoren und der Zerstörung durch das Immunsystem entgehen. Außerdem zeichnen sich die Zellen durch einen veränderten Energiestoffwechsel aus und der Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Außerdem können sie Angiogenese induzieren [4]. Die neoplastischen Zellen tragen nicht allein zur Malignität des Tumors bei, wichtig ist auch das Mikromilieu des Tumors, das durch die EZM und die Zellen des Tumorstromas gebildet wird [6].

### 1.3 Fibroblasten im Tumorstroma

In einigen Tumorarten, zum Beispiel in Brust-, Prostata- und Pankreaskarzinomen, besteht das Stroma hauptsächlich aus CAF [5, 7]. Diese werden in der Literatur insbesondere als pro-inflammatorisch und tumorfördernd beschrieben. Gesunde, normale Fibroblasten zeigen daneben aber auch tumorinhibierende Eigenschaften. Humane, normale Fibroblasten hemmen zum Beispiel das Wachstum von Prostata-, Lungen- und Lymphblastoid-Tumorzelllinien, als Ausdruck ihrer Aufgabe, die Proliferation epithelialer Zellen zu regulieren [7].

#### 1.3.1 Herkunft tumorassoziierter Fibroblasten

Als CAF werden verschiedene fibroblastenartige Zellen im Tumor bezeichnet, die unterschiedlichen Ursprungs sein können. Es handelt sich dabei um umprogrammierte lokale Gewebsfibroblasten oder rekrutierte mesenchymale Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark. Weiterhin können sie von lokalen Fibroblasten-Vorläuferzellen, Adipozyten oder lokalen Sternzellen abstammen. Fibroblastenartige Zellen im Tumor können auch durch den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) entstehen, den manche epitheliale Tumorzellen durchlaufen. Auch proliferierende Endothelzellen können durch endothelial-mesenchymale Transition (EndMT) mesenchymale Eigenschaften erlangen [5, 7-9].

Aufgrund ihrer Heterogenität ist eine Vielzahl von Markern beschrieben, die CAF charakterisieren. Diese sind etwa  $\alpha$ -Glattmuskelaktin ( $\alpha$ SMA), Fibroblasten-spezifisches Protein 1 (FSP1), Vimentin, Thrombozyten-stämmiger Wachstumsfaktorrezeptor- $\beta$  (*platelet-derived growth factor receptor  $\beta$* , PDGFR $\beta$ ) und Fibroblasten-Aktivierungs-Protein (FAP) [8, 9]. Außerdem wurden Popdoplanin, Asporin, *Zinc finger E-box binding homeobox 1* (ZEB1),

## 1 Einleitung

Osteoglycin, Neurogliales Antigen 2 und Prolyl-4-Hydroxylase als CAF-Marker identifiziert [5, 9]. Die genannten Marker befinden sich zum Teil auch auf anderen Zelltypen und ihre Expression kann uneinheitlich sein [5].

Die aus den Tumorzellen stammenden Faktoren wie transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), PDGF- $\alpha/\beta$ , Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Interleukin (IL)-6 und Lysophosphatidsäure können die CAF-Aktivität induzieren [5, 7, 8]. Außerdem fördern Hypoxie und reaktive Sauerstoffspezies die CAF-Aktivierung [5]. Zudem wurden in Fibroblasten des Mammakarzinoms TGF- $\beta$  und CXCL12 als autokrine Stimuli identifiziert, die die Myofibroblasten-Differenzierung initiieren und den CAF-Phänotyp erhalten [8].

### 1.3.2 Einfluss tumorassoziierter Fibroblasten auf die Tumorprogression

CAF können auf vielfältige Weise die Tumorprogression unterstützen. Sie können die Proliferation und Metastasierung der Tumorzellen fördern, sowie deren Phänotyp beeinflussen und zur Angiogenese beitragen.

Die Stimulation der Proliferation von Tumorzellen erfolgt zum Beispiel durch die von CAF sezernierten Wachstumsfaktoren, wie Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), EGF und b-FGF [7]. Sie verstärken die Angiogenese durch die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF)-A [5], durch CXCL12-induzierte Mobilisierung von Endothel-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und durch Rekrutierung pro-angiogener Makrophagen [8]. Die Metastasierung fördern CAF zum Beispiel durch Faktoren wie TGF- $\beta$ , HGF, VEGF, FGF und CXCL12 sowie durch Modulierung der EZM im Tumor [8]. Außerdem stimulieren beispielsweise Brustkrebszellen die Sekretion von CCL5 in MSC. CCL5 wiederum die fördert die Invasivität der Tumorzellen [10]. Weiterhin begünstigen Fibroblasten und vom Tumor sezernierte Zytokine die Tumorprogression, indem sie zur Generierung einer metastatischen Nische beitragen [7]. Außerdem können CAF sich dort zum Beispiel vom Primärtumor aus ansiedeln und auch die Apoptose zirkulierender Tumorzellen verhindern, wenn sie sich gleichzeitig im Blut befinden [8]. Ferner beeinflussen CAF die Selbsterneuerungskapazität mancher Karzinomzellen, erhöhen die Expression des Stammzellmarkers CD133 sowie das CD44/CD24-Verhältnis und fördern EMT [8, 9]. Es wird außerdem berichtet, dass sich CAF in ihrem Metabolismus den Bedürfnissen der Tumorzellen anpassen [5].

Interessanterweise können CAF aber auch tumorhemmende Eigenschaften besitzen. Zum Beispiel werden durch Slit2 tumorfördernde Signalwege über PI3K,  $\beta$ -Catenin und CXCL12/CXCR4 gestört [9].

### 1.3.3 Immunmodulierende Eigenschaften tumorassoziierter Fibroblasten

CAF tragen auch zu inflammatorischen Prozessen im Tumor bei. Die immunmodulierende Gen-Signatur von CAF kann Cyclooxygenase (COX)-2, Osteopontin (OPN), die Chemokine CXCL1, -2, -12, -14, CCL5 und auch IL-6, -1 $\beta$  sowie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) umfassen [7, 9, 11]. Pro-inflammatorische Signale der Fibroblasten können parakrin zum Beispiel durch IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ , aus den Tumorzellen selbst oder von residenten Immunzellen, über NF $\kappa$ B induziert werden [7]. Außerdem tragen CAF zur Rekrutierung von Makrophagen und CD11b+Gr1+Ly6c+ Monozyten bei [7]. Letztere Marker charakterisieren die immunsupprimierend und tumorfördernd wirkenden Monozyten-*Myeloid-derived suppressor-cells* (MDSC) [12]. Nicht nur die Sekretion von Chemokinen durch die Fibroblasten führt zur Rekrutierung von Makrophagen, auch via HAS2 gebildete HA führte zu mehr tumorassozierten Makrophagen (TAM) und mehr Angiogenese im Tumor [13]. CAF beeinflussen zudem das Verhältnis von tumorfördernden Lymphozyten wie regulatorischen T-Zellen (Treg), T-Helfer (Th)-2-Typ Zellen und Th17 Zellen zu tumorhemmenden Th1 Zellen und zytotoxischen T-Zellen [7]. Im murinen Brustkrebsmodell zum Beispiel, induzierten CAF den Wechsel vom Th1-Typ zum Th2-Typ. Ihr Zyto- und Chemokinprofil ermöglicht es ihnen, zur Rekrutierung und Differenzierung von Th17 Zellen und Treg beizutragen. Außerdem gibt es Hinweise, dass von CAF stammendes TGF- $\beta$  die Funktion natürlicher Killerzellen (NK) und CD8+ zytotoxischer T-Zellen hemmt [7].

### 1.3.4 Umbau der extrazellulären Matrix durch tumorassoziierte Fibroblasten

Ein weiterer wichtiger funktioneller Aspekt von CAF ist der Umbau der EZM. Dadurch regulieren sie unter anderem das Volumen und den Druck der interstitiellen Flüssigkeit [5]. Die Beschaffenheit der EZM, zum Beispiel ihre Steifigkeit, beeinflusst die Zellmorphologie, die Integrin-vermittelte Signaltransduktion und den Aufbau des Aktinzytoskeletts [8]. CAF synthetisieren EZM-abbauende Proteasen wie zum Beispiel Matrix-Metalloproteinasen (MMP) [8]. Auch der CAF-Marker FAP besitzt Kollagenase- und Dipeptidylpeptidase-Aktivität [5]. Diese veränderte EZM fördert die Motilität, die Invasion und das Wachstum der Tumorzellen [7]. Es wurde beobachtet, dass CAF den Tumorzellen voranmigrierten und ihnen so Wege bereiteten [8, 9]. MMP können durch den Abbau der EZM-Komponenten die Invasion der Zellen erleichtern und Angiogenese fördern und auch die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren vermitteln. Die Spaltung von Adhäsionsmolekülen verstärkt die Motilität und induziert EMT in manchen Tumorzellen [14].

Des Weiteren synthetisieren CAF EZM-Moleküle wie Kollagen, Fibronectin, Proteoglykane und Glycosaminoglykane wie HA. In der EZM enthaltenes Fibronectin spielt eine Rolle in der

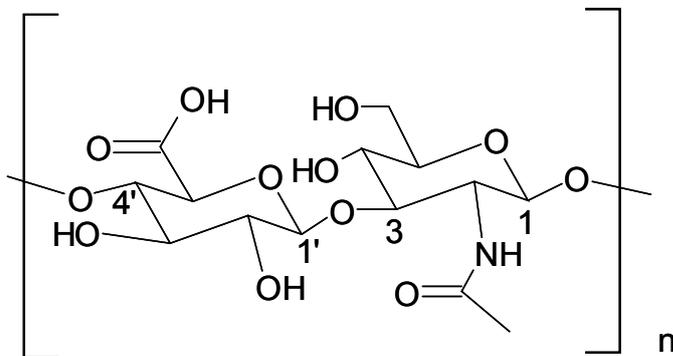
# 1 Einleitung

Zelladhäsion, der Migration und im Wachstum, bindet unter anderem an Integrine und erleichtert Metastasierung [8]. Die Rolle der HA, als weiterer wichtiger Bestandteil der EZM, wird im folgenden Kapitel beschrieben.

## 1.4 Hyaluronsäure

### 1.4.1 Struktur der Hyaluronsäure

Wenn Gewebe schnellen Umbauprozessen unterliegen, kommt verstärkt HA vor, wie zum Beispiel während der Embryogenese, in Entzündungsprozessen und in malignen Tumoren [15]. HA ist ein Hauptbestandteil der EZM im Tumor. Sie ist ein unverzweigtes, nicht-sulfatiertes Glycosaminoglykan bestehend aus  $\beta$ 1,3- und  $\beta$ 1,4-glycosidisch verknüpfter D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin (s. Abbildung 1).



**Abbildung 1. Struktur der Hyaluronsäure.**

Gezeigt sind miteinander verknüpfte Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin.

Ein HA-Molekül kann eine Größe von einigen Millionen Dalton annehmen [16]. Wegen ihrer hohen molekularen Masse und der negativen Ladung kann HA das bis zu 1000-fache ihres Gewichts an Wasser binden und allein dadurch ein Milieu schaffen, in dem Zellen gut migrieren und proliferieren können [15]. Die von der Zelle synthetisierte HA befindet sich entweder im die Zelle umgebenden Medium oder liegt perizellulär gebunden vor. Sie konnte auch intrazellulär detektiert werden [17]. Außerdem kann die Struktur des perizellulären HA-Mantels variieren. Durch verschiedene Stimuli werden Kabel-ähnliche HA-Stränge gebildet, die Leukozyten binden können [18]. HA bindet an die so genannten Hyaladherine, wie TSG6 (*tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene-6*), Inter-alpha-trypsin Inhibitor, Tensacin [17] und HA-Rezeptoren CD44, Rezeptor für HA-vermittelte Motilität (RHAMM), HA-Rezeptor für Endozytose (HARE), *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1* (LYVE-1) und *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) 2 und -4 [16]. HA kann durch Hyaluronidasen und durch freie Radikale fragmentiert werden. In Säugetieren sind sechs Hyaluronidase-Gene (Hyal)-1,-2,-

## 1 Einleitung

3,-4, P1 und PH20 bekannt [16]. Je nach Größe, Konzentration und Bindung assoziierter Moleküle kann sie unterschiedliche Funktionen haben [19, 20].

Gesundes Gewebe enthält oft hochmolekulare HA, während in Tumoren zusätzlich zum Teil kleinere HA-Fragmente zu finden sind [15, 21]. Diese kleinen HA-Fragmente können zum Beispiel die MMP- und Zytokinexpression in Melanomzellen stimulieren [22], dendritische Zellen aktivieren [23], aber auch die Apoptose von Lymphomzelllinien, murinen Mammakarzinomzellen und humanen Kolonkarzinomzellen induzieren [24, 25].

### 1.4.2 Einfluss der Hyaluronsäure auf das Tumorwachstum

In einigen Publikationen wurde die Rolle der HA im Tumorgeschehen durch *knockdown* oder Überexpression der HAS untersucht. In maligne transformierten 3Y1 Fibroblasten der Ratte ist die HAS2-Expression im Vergleich zu nicht-transformierten 3Y1 induziert [19]. Eine HAS-Überexpression in 3Y1 ist allerdings allein nicht tumorigen [26]. Durch HAS2-*antisense* RNA konnte die Tumorigenität der transformierten Zellen reduziert werden – sie zeigten vermindertes adhäsionsunabhängiges Wachstum und eine eher geringere Zahl an gebildeten Tumoren. Interessanterweise war aber die Eigenschaft, Tumore zu bilden, auch durch eine zu starke HA-Produktion durch HAS2-Überexpression vermindert, sodass die Autoren diskutieren, dass es für die Malignität ein Optimum der HA-Konzentration gibt [19]. Analog dazu fanden Tian *et al.*, dass die Krebsresistenz des Nacktmulls auf frühe Kontaktinhibition durch eine starke hochmolekulare-HA-CD44 Wechselwirkung zurückzuführen ist [27]. Die genaue Rolle der HA im Nacktmull und der Zusammenhang mit der Krebsresistenz bedarf weiterer Untersuchungen, da HA in einem anderen krebsresistenten Nager, dem Blindmull, zwar in großen Mengen vorhanden ist, aber nicht für dessen hemmende Effekte auf Tumorzellen verantwortlich war [28].

Übereinstimmend mit einer Hemmung des Tumorwachstums durch HA ist nach HAS-Überexpression das Wachstum von Prostata Tumoren im murinen Modell gehemmt [29, 30]. Bei gleichzeitiger Hyal- und HAS2- und HAS3-Überexpression jedoch, ist das Tumorwachstum in Prostata Tumormodellen erhöht [29, 31]. In Xenografttumoren von ESCC, von Blasenkarzinomzellen und von Brustkrebszellen führte HAS-*knockdown* zu reduziertem Tumorwachstum mit verminderter Proliferation [32-34]. HAS3-Überexpression führte zu erhöhtem Tumorwachstum, adhäsionsunabhängigem Wachstum und verstärkter Proliferation [35]. HAS3-*knockdown* im Kolonkarzinom-Modell führte zu vermindertem Wachstum aufgrund von induzierter Apoptose [36]. Auch HAS1-*knockdown* in Blasenkarzinomzellen führte zu gesteigerter Apoptose [33].

## 1 Einleitung

Zusammenfassend inhibierte eine reduzierte HA-Synthese durch *HAS-knockdown* die Tumorprogression in murinen Modellen. Im Allgemeinen ist festzuhalten, dass je nach Zusammenhang HA tumorfördernde oder tumorhemmende Eigenschaften besitzen kann.

### 1.4.3 Bedeutung der Hyaluronsäure für Zellmotilität und Metastasierung

HA ist wichtig für die Migration, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. *HAS2-knockdown* in Brustkrebszellen und *HAS1-knockdown* in Blasenkarzinomzellen führte zu verminderter Migration und/oder Invasion der Zellen *in vitro* [33, 34, 37]. Entsprechend konnte bei einer Überexpression von HAS3 eine erhöhte Migration von Tumorzellen *in vitro* festgestellt werden [35]. In HAS2- oder HAS3-überexprimierenden Prostatakarcinomzellen führt erst die gleichzeitige Überexpression von Hyal1 zu verstärkter Migration [29]. Die Herunterregulation von HAS2 in Brustkrebszellen reduzierte im Tiermodell außerdem die Bildung von Metastasen [34, 38] und die Überexpression von Hyal1, vor allem mit gleichzeitiger HAS2- und HAS3-Überexpression, führte zu vermehrten spontanen Lymphknotenmetastasen im murinen Prostatatumormodell [29]. Zirkulierende Tumorzellen sollen über CD44-HA-Interaktion besser an Endothelzellen zum Beispiel im Knochenmark oder in der Lunge binden und so Metastasen initiieren [21].

### 1.4.4 Hyaluronsäure und Angiogenese

HA kann außerdem die Angiogenese fördern. In murinen Brustkrebs- und Prostatakarcinommodellen führte die Überexpression von HAS2 bzw. HAS3 zu einer erhöhten Zahl an Gefäßen [35, 39]. Nach Transfektion mit HAS1-, HAS2- und HAS3-*antisense* RNA wurde die Gefäßdichte im Prostata- bzw. Blasenkarzinommodell reduziert [33, 40]. *Knockdown* von HAS2 in CAF führte zu verminderter TAM-Rekrutierung und zu verminderter Angiogenese [13].

### 1.4.5 Hyaluronsäure und epithelial-mesenchymale Transition

HA wird eine wichtige Rolle in der EMT zugesprochen. Überexpression von HAS2 in normalen Mammaepithelzellen induziert einen mesenchymalen Phänotyp mit einem eher spindelförmigen Erscheinungsbild der Zellen statt der typischen Kopfsteinpflaster-Form epithelialer Zellen in Zellkultur [41]. Zusätzlich bilden die Mammaepithelzellen und intestinale Epithelzellen durch HAS2-Überexpression mehr Vimentin, einen mesenchymalen Marker [41, 42]. Außerdem sind Invasivität und adhäsionsunabhängiges Wachstum nach HAS2-Überexpression gesteigert [41]. Auch maligne Pleuramesotheliomzellen zeigen einen fibroblastenartigen Phänotyp nach HAS2-Überexpression mit gesteigerter Motilität und adhäsionsunabhängigem Wachstum [43].

## 1 Einleitung

TGF- $\beta$ , ein typischer Stimulus der EMT, induziert auch die HAS2-Expression. Hemmt man diesen Schritt in murinen Mammaepithelzellen durch HAS2-si RNA, werden die EMT-Marker Fibronectin, ZEB1 und *Snail family zinc finger 1* (SNAI1) weniger durch TGF- $\beta$  stimuliert und die Migration der Zellen ist gehemmt. Interessanterweise ist dieser Effekt nicht durch extrazelluläre HA und CD44 vermittelt [44].

HAS3-Überexpression in epithelialen Lungenadenokarzinomzellen führte zu einem EMT-Phänotyp mit reduzierter E-Cadherin- und gesteigerter Vimentin-Proteinmenge sowie gesteigerter Invasivität [45]. Hingegen zeigte die epitheliale humane Prostatakarzinomzelllinie 22Rv1 nach HAS3-Überexpression eine Reduktion von N-Cadherin, nicht aber von E-Cadherin und eine Reduktion zellulärer Kontakte [46]. In anderen Publikationen wird eine hohe Expression von N-Cadherin mit EMT in Verbindung gebracht [47].

In der Literatur gibt es folglich Hinweise, dass HA die Veränderung des Phänotyps epithelialer Zellen modulieren kann. Ihre Rolle bei Veränderungen im Fibroblasten-Phänotyp wird im folgenden Kapitel erläutert.

### 1.4.6 Einfluss der Hyaluronsäure auf den Myofibroblasten-Phänotyp

Dass HA einen wichtigen Einfluss auf den CAF-Phänotyp ausüben kann, konnte durch Behandlung mit dem HA-Synthese-Inhibitor 4-MU gezeigt werden. In einem murinen orthotopen Modell des hepatozellulären Karzinoms reduzierte die Behandlung mit 4-MU die  $\alpha$ SMA-Färbung im Gewebe.  $\alpha$ SMA ist ein Marker für Myofibroblasten. Entsprechend führte 4-MU in diesem Modell zu einer Reduktion von Myofibroblasten oder reduzierte deren Aktivierungsstatus [48]. Somit stellt 4-MU auch eine mögliche anti-CAF-Therapie dar.

Auch in dermalen Fibroblasten führt 4-MU-Behandlung zu verminderter durch TGF- $\beta$  stimulierte  $\alpha$ SMA-Expression [49].

### 1.4.7 Immunmodulierende Wirkung von Hyaluronsäure

HA kann die Immunantwort auf verschiedenen Wegen modulieren. Zum einen beeinflusst sie die Expression immunmodulierender Proteine, zum Beispiel in manchen Karzinomzellen und Fibroblasten. Zum anderen kann HA auch direkte Effekte auf Immunzellen ausüben.

## 1 Einleitung

In Tumorzellen fördert HA mit geringem Molekulargewicht, nicht aber hochmolekulare HA, die Expression von IL-1 $\beta$  und IL-8 [22, 50]. In Prostatakarzinomzellen konnte die durch 4-MU reduzierte Expression von IL-8 und den Chemokinrezeptoren CXCR1,4,7 durch exogene HA wieder erhöht werden [51]. Die Rolle der HA bezüglich immunmodulierender Expression wurde bisher nicht in CAF untersucht. In Synovialfibroblasten führte die Behandlung mit einem HA-Hexamer zu induzierter IL-18- und IL-33-Synthese, nicht aber die Behandlung mit HA mittleren Molekulargewichts [52]. In humanen dermalen Fibroblasten induzierte das HA-Dodecamer deutlich die TGF- $\beta$ 1 und -3 Expression [53]. Weiterhin konnte niedermolekulare HA IL-6, -8, CXCL1,-2,-6 und CCL2 und -8 in dermalen Fibroblasten induzieren [54].

HA hat ebenfalls einen direkten Einfluss auf Zellen des Immunsystems. Stromal-exprimierte HAS2 etwa spielt eine Rolle bei der TAM-Rekrutierung [13]. HA mit geringem Molekulargewicht induziert CCL3, CCL4, CCL5, IL12, Interferon- $\beta$  in Makrophagen [55-57] und kann im Gegensatz zu HA mit hohem Molekulargewicht als Adjuvans die T-Zell-Aktivierung fördern [55]. HA-Fragmente können, wie bereits erwähnt, dendritische Zellen aktivieren [23], IL-8 und IL-6 in Monozyten stimulieren [58].

### 1.4.8 Hyaluronsäure im Tumorgewebe

Einige Studien untersuchten eine Korrelation zwischen der HA-Menge und krankheitsfreiem sowie Gesamtüberleben in verschiedenen Tumorentitäten. Dabei wurde bei einigen Publikationen HA im Tumorstroma und in den Tumorzellen selbst unterschieden. Für einige Tumorarten ist die Stärke der HA-Färbung ein prognostischer Faktor. So ist eine vermehrte HA-Färbung des Tumorstromas bei Brustkrebs, nicht-kleinzelligem Lungenadenokarzinom und differenziertem Schilddrüsenkarzinom mit verkürztem Überleben oder krankheitsfreiem Überleben assoziiert. Bei Brustkrebs und nicht-kleinzelligem Lungenadenokarzinom konnte es sogar als unabhängiger negativ-prognostischer Faktor identifiziert werden [59-61]. Auch die parenchymale HA war bei Brustkrebs, kolorektalem Karzinom und Magenkarzinom mit verkürztem Überleben verbunden, konnte aber nur im Fall des kolorektalen Karzinoms als unabhängiger prognostischer Wert identifiziert werden [59, 62, 63]. In Studien, die nur die gesamte HA-Menge betrachteten, war viel HA mit verkürztem Überleben in malignen peripheren Nervenscheidentumoren und in duktalem Adenokarzinomen des Pankreas verbunden [64, 65]. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Publikationen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Im Ösophaguskarzinom konnte HA sowohl im Parenchym als auch im Stroma detektiert werden und war im *Carcinoma in situ* mehr vorhanden als im normalen Epithel [66].

# 1 Einleitung

**Tabelle 1. Vorhersagewert der Hyaluronsäure-Menge in malignen Tumoren**

Tumor, Autor, Jahr	Stromale HA		Parenchymale HA	
	UniV	Cox Multi	UniV	Cox Multi
Brustkrebs Auvinen, 2000 [59]	HA↑ S↓ DFS↓	HA↑ S↓	HA↑ S↓ DFS ∅	∅
Kolorektales Karzinom Ropponen 1998 [62]	S ∅ DFS ∅	∅	HA↑S↓DFS↓	HA↑ S↓DFS↓
nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom Pirinen, 2001 [60]	Adenokarzinom: HA↑ DFS↓	Adenokarzinom: HA↑ DFS↓	S: ∅ HA↓ DFS↓ Adenokarzinom: HA↑ n.s. Trend S↓	DFS: ∅
Magenkarzinom Setälä 1999 [63]	S: ∅	∅	HA↑ S↓ Kurativ operierte Patienten (Stadium I + II ) HA↑ S: ∅	S: ∅
differenziertes Schilddrüsenkarzinom Böhm, 2002 [61]	HA↑ S↓ DFS ∅	S: ∅	S: ∅ DFS: ∅	∅
UniV gesamter Tumor		Multivariate Analyse ges. Tumor		
Brustkrebs Auvinen, 2000 [59]	s.o.		Untergruppe mit HA↑ in stromalen <u>und</u> Tumorzellen: S↓	
Maligner peripherer Nervenscheidentumor Ikuta, 2014 [64]	HA↑ S↓ DFS↓		HA↑ DFS↓ HA↑ n.s. Trend S↓	
Orales Plattenepithelkarzinom Kosunen 2004 [67]	HA↓S↓ DFS↓		HA↓S↓ DFS↓	
duktales Adenokarzinom des Pankreas Cheng, 2013 [65]	HA↑ S↓		HA↑ S↓	

UniV: Univariate Analyse

Cox Multi: Cox's multivariate Überlebensanalyse

DFS: krankheitsfreies Überleben, definiert als Zeitspanne zwischen Diagnose oder chirurgischer Entfernung und Wiederauftreten des Tumors oder von Metastasen, Patienten mit Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose wurden z.T. ausgeschlossen (*disease-free survival*)

S: Überleben, definiert durch alle Todesursachen oder tumorbedingten Tod (*survival*)

∅: HA Expression hat keinen signifikanten prognostischen Wert

n.s.: nicht signifikant

**Rote Schrift** kennzeichnet den Zusammenhang von einer hohen HA-Menge mit einer schlechten Prognose. **Grüne Schrift** kennzeichnet den Zusammenhang von einer geringen HA-Menge mit einer schlechten Prognose.

### 1.5 Hyaluronsäuresynthasen

#### 1.5.1 Hyaluronsäuresynthese

Die HA-Synthese findet im Gegensatz zur Synthese anderer Glucosaminoglykane an der Plasmamembran statt [16, 17]. Die gebildete HA wird in den extrazellulären Raum extrudiert, sodass sehr lange HA-Ketten entstehen können [68]. Die HAS-Proteine selbst werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert und müssen aktiviert werden, um dann alternierend Glucuronsäure (GlcUA) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) an das reduzierende Ende des entstehenden HA-Polymers zu knüpfen [17]. Als Substrate dienen dabei Uridindiphosphat (UDP)-GlcUA und -GlcNAc. Nicht eindeutig ist, ob die HAS-Proteine im Golgi oder im ER aktiv sind [16, 17, 69, 70].

#### 1.5.2 Struktur der Hyaluronsäuresynthasen

HAS sind evolutionär konserviert. Humane und murine HAS besitzen eine intrazelluläre Schleife, die eine Konsensussequenz von Glycosyltransferase-Domänen enthält. Zusätzlich wurden sieben mögliche Membrandomänen identifiziert, zwei am N-terminalen und fünf am C-terminalen Ende [71]. Besonders an den HAS ist, dass sie beide Substrate binden und sowohl als Glycosyltransferase als auch als Translokase fungieren können [68, 72]. Es wird allerdings auch diskutiert, dass die HA-Sekretion durch einen ABC-Transporter vermittelt wird [73, 74]. In Brustkrebszellen jedoch führte die Behandlung mit Inhibitoren des ABC-Transporters nicht zu verminderter HA-Produktion [75]. In den letzten Jahren wurden HAS2-Homooligomerisierung und auch HAS2-HAS3-Heterooligomerisierung gefunden, die dem ersten Modell der HAS-Proteine, die als Monomer vorliegen, widersprechen [18, 76].

#### 1.5.3 Regulation der Hyaluronsäuresynthese

Die HA-Synthese kann durch Veränderung der Transkription und der mRNA-Stabilität der HAS, aber auch durch posttranskriptionelle Modifikation beeinflusst werden. Die Transkription der HAS2 kann zum Beispiel durch CREB1, STAT3, *all-trans*-Retinoinsäure, Sp1 oder NFκB induziert werden [18]. Externe Stimuli wie PDGF, FGF-2, Keratinozyten-Wachstumsfaktor, EGF, TGF-β, IL-1β, TNF-α und Interferon-γ induzieren die HAS-Expression, während sie beispielsweise durch Corticoide reduziert wird [18]. Für HAS2 ist ein natürliches *antisense*-Transkript bekannt, das zum einen als HAS2-transkriptionsfördernd und HAS2-mRNA stabilisierend beschrieben wurde, zum anderen aber nach Überexpression die HAS2-mRNA reduzierte [77-79].

## 1 Einleitung

Außerdem wird HAS2 posttranskriptionell modifiziert, indem sie am Serin in Position 221 O-glycosylisch mit GlcNAc verbunden wird und dadurch ihre Stabilität und die HA-Produktion steigen [16]. Weiterhin wird sie durch Proteinkinase C phosphoryliert und damit wird ihre Aktivität erhöht [17, 80]. Eine Phosphorylierung an Threonin in Position 110 durch AMPK inhibiert hingegen die HAS2-Aktivität [81]. Auch Ubiquitinylierung der HAS2 konnte festgestellt werden. Dabei war eine Mono-Ubiquitinylierung wichtig für ihre Aktivität [76].

Weiterhin ist die Aktivität der HAS abhängig von der Bereitstellung der UDP-GlcNAc- und UDP-GlcUA-Substrate durch UDP-Glucose-Phosphorylase und UDP-Glucose-Dehydrogenase. Auch die Zusammensetzung der Membran könnte die Aktivität der HAS beeinflussen, zum Beispiel könnte der Cholesterolgehalt eine Rolle spielen [82, 83].

### 1.5.4 Isoformen der Hyaluronsäuresynthasen

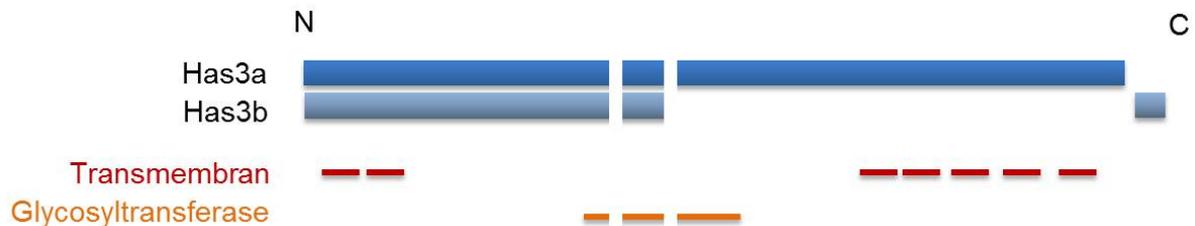
HA wird in Säugetieren von drei HAS-Isoformen synthetisiert. In Tabelle 3 im Anhang sind die zurzeit bekannten humanen und murinen Isoformen aufgelistet, deren möglichen Splicevarianten und *antisense*- und nicht-codierende RNA.

Die drei HAS-Isoformen können sich in ihrer Lokalisierung in Geweben unterscheiden, zum Beispiel im Mausembryo oder auch in der Lokalisierung innerhalb der Zelle [84, 85]. HAS1 wurde vor allem im Golgi-Apparat, HAS2 im ER und HAS3 im Golgi und Microvilli gefunden [84]. Die drei Isoformen spielen unterschiedliche Rollen in der Embryonalentwicklung. Während *Has2-knockout*-Mäuse embryonal wegen schwerer vaskulärer und kardialer Fehlbildungen versterben [86], leben *Has1*- und *Has3-knockout*-Mäuse und sind fertil [13, 87]. Im Gegensatz zu HAS2 und HAS3 benötigt HAS1 mehr UDP-GlcNAc für die HA-Synthese nach Transfektion von COS-1-Zellen [88] und in HAS1-transfizierten MCF7-Zellen wurde HA erst durch Glucose- und Glucosamin-Zusatz oder auch durch Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder TGF- $\beta$  detektierbar. Während der von HAS2 und HAS3 gebildete perizelluläre HA-Mantel kein CD44 benötigt, verschwand der von HAS1 gebildete HA-Mantel durch einen CD44-blockierenden Antikörper [89].

Humane HAS1 und HAS3 unterliegen alternativem Splicing. Aberrante HAS1-Splicevarianten wurden zum Beispiel in Proben von Patienten mit Waldenströms Makroglobulinämie [90], mit Blasenkarzinom [91] und mit Multiplem Myelom detektiert [92, 93]. Die aberranten HAS1-Splicevarianten oligomerisierten mit dem langen HAS1-Protein über Disulfidbindungen und veränderten deren Stabilität und Zelllokalisierung [70]. Die NCBI Gene-Datenbank [94] listet zwei HAS3-Proteinprodukte auf. Isoform a (HAS3a), mit 553 Aminosäuren, Glycosyltransferasedomäne und sieben Transmembrandomänen ist die

## 1 Einleitung

längere Isoform und das Produkt der Transkriptionsvarianten 1 und 3. Isoform b (HAS3b) ist das Produkt der HAS3 Transkriptionsvariante 2 (*HAS3v2*). Sie wird aus nur 281 Aminosäuren gebildet und gleicht N-terminal mit zwei Transmembrandomänen und einem Teil der postulierten Glycosyltransferasedomäne der Isoform a [94-96]. In Abbildung 2 sind die HAS3-Isoformen a und b schematisch dargestellt.



**Abbildung 2. Hyaluronsäuresynthase 3-Isoformen a und b.**

Schematische Darstellung der Proteinstrukturen von HAS3a und -b. Gleiche Sequenzen sind untereinander dargestellt und Exongrenzen durch Unterbrechungen gekennzeichnet. Die Lage und Zahl der Transmembrandomänen und der Glycosyltransferase-2-ähnlichen Domäne orientiert sich an Angaben aus der Ensembl-Datenbank [97].

Has3b befindet sich vor allem im ER und Golgi. Die mRNA der Transkriptionsvariante 2 konnte in Adenokarzinomen des Ösophagus detektiert werden, sie wurde durch EGF stimuliert und ihre Überexpression führte zu verstärkter Proliferation *in vitro* und in *in vivo*-Xenograftmodellen, sowie zu erhöhter ERK-Phosphorylierung [3].

## 1.6 Hyaluronsäure in der Tumorthherapie

### 1.6.1 Wirkung von Hyaluronsäure-Oligosacchariden

Da HA in unterschiedlicher Weise das Tumorgeschehen positiv beeinflussen kann, wurde sie als möglicher therapeutischer Angriffspunkt in *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen getestet. Die antagonistische Wirkung von HA-Oligosacchariden an HA-Rezeptoren wie CD44 ist mit reduziertem Tumorwachstum von zum Beispiel malignen peripheren Nervenscheidentumoren, Mamma-, Lungen- und Ovarialkarzinomen *in vivo* und reduziertem adhäsionsunabhängigem Wachstum und Apoptose *in vitro* verbunden [25, 98, 99].

### 1.6.2 Hyaluronidasen in der Tumorthherapie

*In vivo*-Experimente mit PEGPH20, einer Hyaluronidase, die physiologisch auf der Spermienoberfläche vorkommt, und für die Experimente pegyliert wurde, um die Halbwertszeit zu verlängern, führte zu einer Hemmung des Tumorwachstums von nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom- (*non-small cell lung carcinoma*, NSCLC) und Prostatakarzinom-Xenografttumoren. Die Wirkung erklären die Autoren durch eine veränderte Architektur des Tumormikromilieus und daran assoziierte lösliche Faktoren, die

## 1 Einleitung

für das Tumorwachstum notwendig sind. Dies würde auch die fehlende Wirksamkeit der PEGPH20 auf die Tumorzellen in 2D-Zellkultur erklären [100, 101]. Auch in Brustkrebs-Xenograftmodellen führte die Behandlung mit Hyaluronidase zu einer Reduktion des Tumolvolumens [102]. Im murinen Modell des duktales Adenokarzinoms des Pankreas erwies sich die Kombination aus PEGPH20 und Gemcitabin als wirksam, vermutlich durch eine verbesserte Exposition der Karzinomzellen mit Gemcitabin [103]. Tumor-endogene Hyaluronidase hingegen ist mit verstärktem Tumorwachstum, Invasion und Angiogenese assoziiert und ihre Hemmung durch sulfatierte Hyaluronsäure reduziert das Tumorwachstum *in vivo* [104].

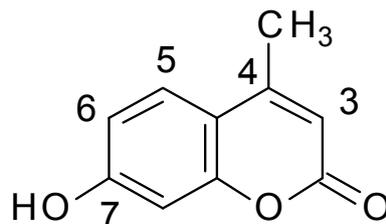
### 1.6.3 anti-CD44-gerichtete Tumorthherapie

Tumor-fördernde HA-Signalwege können auch auf der Ebene der HA-Rezeptoren gehemmt werden. CD44 ist neben einem HA-Rezeptor auch ein Tumorstammzellmarker. Es unterliegt alternativem Splicing. Standard-CD44 kommt in normalen und in Tumorgewebe häufig vor, CD44-Splicevarianten (CD44v) werden vor allem von Tumorzellen gebildet [105]. So war anti-CD44-gerichtete Tumorthherapie Gegenstand einiger Untersuchungen. Im murinen Modell wurde eine Immunisierung mit humanen CD44v3-v10 getestet, die ein deutlich reduziertes Tumorwachstum von humanen-CD44v-transfizierten Maus-Adenokarzinomzellen zur Folge hatte [106]. *In vivo*-Behandlung von intraperitonealen Xenografttumoren mit Nanopartikeln mit *small hairpin* (sh) RNA gegen CD44 reduzierte das Tumorwachstum [107]. Außerdem wurde bereits in Studien an Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs, des Ösophagus und Brustkrebs Bivatuzumab getestet. Dies ist ein humanisierter monoklonaler anti-CD44v6-Antikörper, der in den Studien mit <sup>186</sup>Re oder mit einem Maytansinoid-Zytostatikum gekoppelt war, sodass die Bindung an CD44v6 eine spezifisch auf die Tumorzellen gerichtete Therapie gewährleisten sollte. Aufgrund eines Todesfalls nach toxischer epidermaler Nekrolyse wurden die Studien eingestellt [108-111].

### 1.6.4 4-Methylumbelliferon

Eine andere Möglichkeit ist, die HA-Synthese mit 4-MU (s. Abbildung 3) zu hemmen. 4-MU ist ein 7-Hydroxycumarin-(Umbelliferon)-Derivat, das aufgrund seiner choleretischen Eigenschaften als Nahrungsergänzungsmittel bzw. als Arzneimittel in verschiedenen Ländern in den Verkehr gebracht wurde. Es ist generell gut verträglich [112].

## 1 Einleitung



**Abbildung 3. Struktur von 4-Methylumbelliferon.**

Umbelliferon kommt in verschiedenen Pflanzenarten vor und wird zum Beispiel von *Apiaceae* (*Umbelliferae*) wie Engelwurz (*Angelica archangelica*) und Liebstöckel (*Levisticum officinale*) aber auch Kamille (*Matricaria chamomilla*, *Asteraceae*) und Lavendel (*Lavandula officinalis*, *Lamiaceae*) gebildet [113]. Für die HA-Synthese-hemmende Wirkung ist die Hydroxygruppe in Position 7 und eine Methylgruppe in Position 3 oder 4 wichtig. Eine zusätzliche Hydroxygruppe in Position 5 oder 6 könnte sogar die HA-Synthese-hemmende Wirkung verstärken [114].

4-MU kann auf unterschiedliche Weise die HA-Synthese hemmen. Je nach Testsystem wurden sowohl transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Wirkmechanismen gefunden. Außerdem kann 4-MU die Verfügbarkeit der Substrate beeinflussen. Es wird durch endogene UDP-Glycosyltransferasen glucuronidiert und reduziert damit den UDP-GlcUA-Pool, der für die HA-Synthese benötigt wird. Da die HA-Synthese an der Plasmamembran stattfindet, ist sie insbesondere auf die im Zytosol vorliegende Menge der UDP-GlcUA angewiesen. UDP-GlcUA ist allerdings vor allem im Golgi zu finden, dem Ort, an dem andere Glucosaminoglykane synthetisiert werden, da sie von hochaffinen Transportern dort hinein gepumpt wird. Daher, so diskutieren die Autoren, wird durch 4-MU spezifisch die HA-Synthese gehemmt [115, 116].

Möglicherweise beeinträchtigt 4-MU auch das *Trafficking* der HAS zur Plasmamembran, denn dort ist nach Behandlung weniger HAS3 zu finden [69]. In einigen humanen Tumorzelllinien reduziert 4-MU die Expression der *HAS2*- und/ oder der *HAS3*-mRNA [116]. Die posttranskriptionelle Modifikation der *HAS2* durch Phosphorylierung ist in Fibroblasten unter 4-MU Behandlung geringer im Vergleich zur Kontrolle [80]. Nicht nur die HA-Synthese, sondern auch die HA-Signaltransduktion kann durch 4-MU beeinträchtigt werden. So ist auch die Menge der HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM unter Behandlung mit 4-MU reduziert [51].

Je nach betrachtetem System kommt es unter 4-MU-Behandlung zum Verlust von Filopodien und Spaltung der fokalen Adhäsionskinase (FAK), zu einer Hemmung des ERK-Signalwegs

## 1 Einleitung

[117] oder des AKT-Signalwegs [51, 118, 119], mit resultierenden anti-proliferativen [48, 117, 120], anti-migratorischen [51, 116-118], anti-invasiven [51, 118, 120] oder apoptotischen [51, 119] Effekten. In Fibroblasten und Melanomzellen wird außerdem eine möglicherweise HA-unabhängige Hemmung des Zellwachstums durch 4-MU diskutiert [120]. Die Behandlung mit 4-MU in ESCC- und Prostatakarzinom-Xenograftmodellen führte zu reduziertem Tumolvolumen [32, 51]. Allerdings war das Tumolvolumen nicht in allen Studien unter 4-MU-Behandlung signifikant reduziert [48, 118]. 4-MU erwies sich aber auch als besonders gut wirksam in der Kombination mit Gemcitabin [121], Sorafenib [122] und Trastuzumab [123]. Außerdem hemmte es die Zahl der auftretenden Metastasen in mehreren *in vivo*-Modellen [38, 118, 124, 125].

### 1.7 Ösophaguskarzinom

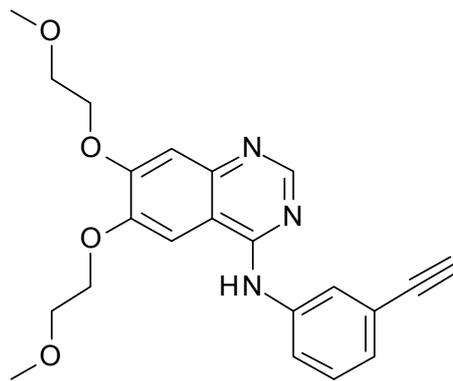
Statistiken zeigen, dass im Jahr 2012 weltweit schätzungsweise 456 000 maligne Neoplasien des Ösophagus neu diagnostiziert wurden und etwa 400 000 Patienten an den Folgen dieser Erkrankung verstarben. Circa 80 % der Fälle traten in weniger entwickelten Ländern auf und Männer waren häufiger betroffen als Frauen. Das Verhältnis von Mortalität zu Inzidenz betrug 0,88 und verdeutlicht die mit dieser Erkrankung verbundene schlechte Prognose [2]. Maligne Neoplasien des Ösophagus sind hauptsächlich Plattenepithelkarzinome oder Adenokarzinome (EAC). Sarkome und kleinzellige Karzinome sind seltener [126]. In den westlichen Ländern nimmt die Inzidenz des EAC zu, während die des ESCC eher stabil bleibt [127, 128]. Das könnte an veränderten Häufigkeiten von Risikofaktoren durch eine Änderung des Lebensstils liegen. Risikofaktoren für ESCC sind Rauchen und der Konsum von Alkohol, während Risikofaktoren für EAC gastroösophageale Refluxkrankheit und ein erhöhter *Body-Mass-Index* sind [129]. Die Therapie des Ösophaguskarzinoms richtet sich nach Stadium, Lokalisierung und Histologie des Tumors und nach der Verfassung und den Wünschen des Patienten. Sie kann chirurgische Eingriffe, sowie eine Bestrahlungs- und Chemotherapie umfassen. Platin-Derivate, 5-Fluorouracil und Taxane werden für die Therapie des ESCC empfohlen [129].

### 1.8 Erlotinib zur Behandlung des Ösophaguskarzinoms

Erlotinib (s. Abbildung 4) ist ein EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor, der die intrazelluläre Phosphorylierung des EGFR hemmt. Es ist zur Erstlinientherapie des NSCLC mit aktivierenden EGFR-Mutationen zugelassen. Diese befinden sich in der Kinasedomäne des EGFR und führen zu einer sehr starken Stimulation EGFR-vermittelter pro-proliferativer und anti-apoptotischer Signale [130]. Diese Stimulation wird durch die Bindung von Erlotinib an der ATP-Bindungsstelle gehemmt. Im Mausmodell mit EGFR-Mutationen führte die Behandlung mit Erlotinib zu einer Tumorregression, die durch gehemmte Zellproliferation

## 1 Einleitung

und Apoptose erklärt werden konnte [131]. Auch Patienten mit EGFR-Mutationen wiesen eine deutlich längere progressionfreie Überlebenszeit unter Erlotinib-Behandlung auf. Diese betrug 10,4 Monate im Vergleich zu 5,2 Monaten unter Chemotherapie. Außerdem ist Erlotinib indiziert zur Erhaltungstherapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC mit unverändertem Krankheitszustand nach Standard-Chemotherapie oder zur Behandlung nach Versagen von mindestens einer vorausgegangenen Chemotherapie. Eine weitere Indikation ist das metastasierte Pankreaskarzinom, bei dem es zusammen mit Gemcitabin eingesetzt wird [132].



**Abbildung 4. Struktur von Erlotinib.**

Bisher gibt es keine Zulassung von Erlotinib zur Behandlung des Ösophaguskarzinoms. Es gibt wenige Phase-I- und Phase-II-Studien, in denen Erlotinib als Monotherapie oder in Kombination mit Radio- oder Chemotherapie eingesetzt wurde. Diese Studien sind in Tabelle 4 im Anhang zusammengefasst. Wegen der geringen Patientenzahl, heterogener Patientenkollektive und unterschiedlichen Behandlungen sind die Studien untereinander nicht vergleichbar und es ist schwierig, definitive Aussagen zur Wirksamkeit zu treffen. Auch fehlt in diesen Phase-I- und -II-Studien der Vergleichsarm, um den Beitrag von Erlotinib zum Behandlungserfolg bewerten zu können. Nur sehr ausgeprägte Wirkungen (etwa Heilung aller Studienteilnehmer) würde man in dieser Form der Studien erfassen. Das Gesamtüberleben in den Studien, in denen Erlotinib eingesetzt wurde, betrug 6,7 – 30,2 Monate [133, 134] und vollständiges Ansprechen wurde in 2,3 – 45,8 % der Patienten beobachtet [134, 135]. In anderen Studien zu Chemotherapie oder Chemoradiotherapie mit oder ohne chirurgischen Eingriff schwanken die Angaben zu Gesamtüberlebenszeiten ebenfalls stark. Sie werden von 9 Monaten bis hin zu 53,8 Monaten beziffert. Vollständiges Ansprechen wurde in diesen Studien in 22,4 % bis zu 57 % der Patienten beobachtet [136-142]. Vor diesem Hintergrund zeigen die Therapien des Ösophaguskarzinoms, die Erlotinib einschließen, nur moderate Wirksamkeit.

## 1 Einleitung

In einigen der Studien wurde untersucht, ob EGFR-Mutationen, EGFR-Genamplifikationen oder EGFR-Expression einen prognostischen Wert im Hinblick auf ein Ansprechen auf die Erlotinib-Behandlung hatten. EGFR-Mutationen wurden in bis zu 14 % der Gewebeproben von Ösophaguskarzinomen gefunden [134, 143-146]. Wegen der geringen Patientenzahlen und der nicht häufig vorkommenden aktivierenden EGFR-Mutationen und EGFR-Genamplifikationen [147, 148] im Ösophaguskarzinom konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen EGFR-Status und Therapieerfolg gefunden werden [148-150], obwohl EGFR in den meisten Tumoren exprimiert wurde [134, 149, 150]. Interessanterweise sehen Ilson *et al.* einen Trend zu besserem Ansprechen von Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zum Adenokarzinomen [149]. Häufige unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Erlotinib sind Diarrhoe und *Rash* (Ausschlag).

### 1.9 Zielsetzung

HA und HAS-Isoformen können durch unterschiedliche Mechanismen eine wichtige Rolle im Tumorgeschehen spielen. Ziele der vorliegenden Arbeit sind daher:

- i) die HAS3-Isoform b auf mögliche Bildung von Homo- und Heterooligomeren hin zu überprüfen und eventuell daraus folgende Konsequenzen für die HA-Synthese zu untersuchen
- ii) die Regulation der HA-Synthese in der Interaktion von ESCC-Zellen und Fibroblasten *in vitro* und ihre mögliche Rolle im Tumorgeschehen zu untersuchen
- iii) die Kombinationstherapie aus dem HA-Synthese-Inhibitor 4-MU und Erlotinib im *in vitro*-Modell des ESCC zu evaluieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellversuche

#### 2.1.1 Isolation primärer muriner Fibroblasten

##### 2.1.1.1 Isolation von murinen Hautfibroblasten

Zur Isolation von murinen Hautfibroblasten (SF) aus männlichen BomTac:NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>- (NMRI *nude*) Mäusen (Taconic Biosciences, Inc., Hudson, USA) und ROSA26CreER<sup>T2 +/-</sup> /HAS2<sup>flox/flox</sup> wurde ein mindestens 2 x 2 cm großes Stück Haut nach oberflächlicher Desinfektion aus der toten Maus entnommen. Das Hautstück wurde mindestens 15 min auf Eis in Chill Protec® Medium (Biochrom AG, Berlin) inkubiert und anschließend in eine Lösung von 5 mg/ml Dispase II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in sterilem Gibco® DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS), Life Technologies™, Paisley, UK) überführt und über 45 min bei 37 °C partiell enzymatisch verdaut. Anschließend wurden die dermalen Zellen durch Schaben mit einem Skalpell von der Epidermis getrennt und für 1 Stunde bei 37 °C mit Hilfe einer Lösung von 4 mg/ml Collagenase aus *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, USA) in Gibco®DPBS verdaut. Durch Zugabe von eiskaltem Fibroblasten-Medium zu gleichen Teilen wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen durch dreimaliges kurzes Schütteln auf dem Vortexmischer separiert und durch *EASY-strainer*<sup>TM</sup> Filter mit 70-100 µm Maschenweite (Greiner BIO-ONE, Frickenhausen) von größeren Gewebestücken getrennt. Die Zusammensetzung der in der Zellkultur verwendeten Medien ist in Tabelle 5 im Appendix aufgelistet. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000xg wurde das Zellsediment in Fibroblasten-Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden standardmäßig bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten und das Medium wurde 2 Tage nach der Isolation erneuert. Fibroblasten, die aus ROSA26CreER<sup>T2 +/-</sup> /HAS2<sup>flox/flox</sup> isoliert wurden, wurden nach der Isolation in Passage 0 oder in Passage 1 entweder mit absolutem Ethanol (Vehikel) oder mit 4-Hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 500 nM für mindestens 24 Stunden behandelt. 4-Hydroxytamoxifen induziert die nukleären Translokation der Cre-Rekombinase und in der Folge die Rekombination von Teilen des *Has2*-Gens. Der *knockdown* der *Has2*-mRNA wurde nach reverser Transkription durch anschließende quantitative *Realtime*-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) Experimente bestätigt.

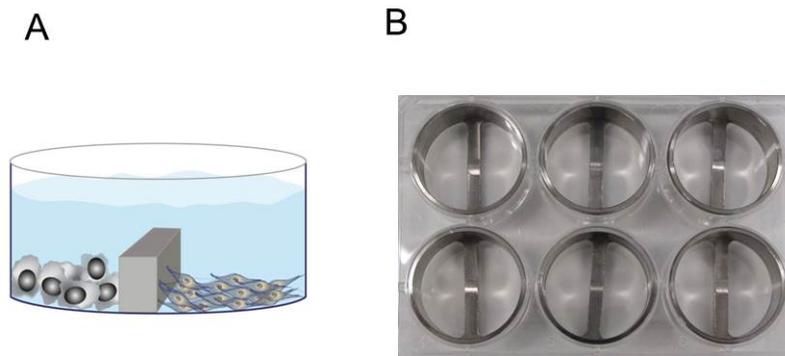
### 2.1.1.2 Isolation tumorassoziierter Fibroblasten

CAF wurden mit Hilfe von an Antikörper gekoppelten magnetischen Perlen aus ESCC-Xenografttumoren isoliert. Die ESCC-Xenografttumoren stammten aus NMRI *nude* Mäusen, denen ESCC-Zellen subkutan in die Flankenregion injiziert wurden. Die Tierversuche wurden von Herrn Dr. Till Freudenberger durchgeführt und vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Bezirksregierung Düsseldorf entsprechend § 8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 genehmigt (Aktenzeichen 8.87-50.10.37.09.203).

Die Tumore wurden mit einem Skalpell zerkleinert und in einer Lösung aus 12 mg Collagenase aus *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich) und 4,8 mg Dispase II (Roche Diagnostics GmbH) in 5 ml Tumorzell-Medium in einem gentleMACS™ C Reaktionsgefäß (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) für 20 min bei 37 °C geschüttelt. Durch zweimaliges Ausführen des Programms „m\_impTumor\_04“ des gentleMACS™ Dissoziators (Miltenyi Biotec GmbH) wurde das Gewebe weiter zerkleinert und anschließend für 20 min bei 37 °C unter Schütteln verdaut. Nach wiederholtem Zerkleinern mit dem gentleMACS™ Dissoziators wurden die Zellen von größeren Gewebestücken durch einen *EASY-strainer™* Filter mit 40 µm Maschenweite getrennt. Um die Ausbeute zu erhöhen wurden gentleMACS™ C Reaktionsgefäße und Filter mit 5 ml sterilem Gibco® DPBS gespült. Die Zellen wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 300xg sedimentiert, der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 80 µl sterilfiltrierter Lösung von 0,5 % (m/m) bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich), 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Merck KGaA, Darmstadt) in Gibco®DPBS resuspendiert. Dazu wurden 20 µl einer Suspension von anti-Maus-Feeder-Antikörper-konjugierten Mikroperlen (*Feeder Removal MicroBeads*, Miltenyi Biotec GmbH) pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C und Equilibrierung der magnetischen Säulen mit sterilfiltrierter Lösung von 0,5 % (m/m) BSA, 2 mM EDTA in Gibco®DPBS wurde die Zellsuspension mit der BSA/EDTA/PBS-Lösung auf 500 µl aufgefüllt und über eine magnetische Säule (*MS Column*, Miltenyi Biotec GmbH) auf dem MiniMACS™ Separator (Miltenyi Biotec GmbH) durch viermaliges Waschen mit 500 µl der BSA/EDTA/PBS-Lösung aufgereinigt. CAF wurden in der Säule zurück gehalten und durch Entfernen des Magneten gewonnen. Sie wurden dann in einer Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche in Fibroblasten-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Protokoll orientiert sich an den Herstellerangaben der *Feeder Removal MicroBeads* (Miltenyi Biotec GmbH).

### 2.1.2 Direkte und indirekte Ko-Kultur

Neben SF wurden humane KYSE-410-Zellen (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) für die *in vitro*-Versuche benutzt. Sie stammen aus einem schlecht differenzierten, invasiven Plattenepithelkarzinom des Ösophagus eines 51 Jahre alten männlichen japanischen Patienten. Sie wurden in Tumorzell-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Bestimmung der *HAS*-mRNA-Expression und der HA-Konzentration im Zellkulturüberstand wurden 50 000 Zellen pro Loch in direkter Ko-Kultur oder in Monokultur in einer 6-Loch-Zellkulturplatte (Greiner BIO-ONE) ausgesät und nach 24 Stunden lysiert. Für die indirekte Ko-Kultur wurden die Zellsorten getrennt durch einen Steg in 500 µl Tumorzell-Medium ausgesät. Dazu wurde ein autoklavierbarer Metalleinsatz mittels 0,8 % (m/m) in Wasser aufgekochter Agarose in der 6-Loch-Platte befestigt (s. Abbildung 5). Nach dem Adhärenzieren der Zellen wurde das Medium abgesaut und durch 2 ml Tumorzell-Medium ersetzt, sodass ein Austausch löslicher Faktoren beider Zellsorten über das Medium gewährleistet wurde.



**Abbildung 5. Einsätze für die indirekte Ko-Kultur.**

**A**, Schematische Abbildung der indirekten Ko-Kultur. **B**, Foto der Einsätze in einer 6-Loch-Zellkulturplatte. Die Einsätze wurden entworfen und hergestellt von Frau Petra Rompel und Herrn Detlev Rohrbach. Die schematische Zeichnung ist von Frau Regina Flahs.

### 2.1.3 Transfektion

#### 2.1.3.1 Transfektion von KYSE-410-Zellen und Hautfibroblasten mit si RNA

KYSE-410-Zellen und SF wurden mit kurzer interferierender RNA (si RNA) transfiziert, die gegen *HAS2*,-3, *CD44* und *RHAMM* sowie gegen Basigin und *Lymphoid enhancer-binding factor 1 (Lef1)* gerichtet war. Dazu wurde ein modifiziertes Protokoll des Herstellers zur reversen Transkription mit Lipofectamine® RNAiMAX (Life Technologies™, Carlsbad, USA) angewendet. In 6- und 12-Loch-Zellkulturplatten wurden 24 pmol bzw. 12 pmol si RNA (FlexiTube si RNA, Qiagen, Hilden, s. Tabelle 6 im Anhang), im Fall von *Lef1* 72 pmol si RNA bzw. Kontroll-si RNA, mit 400 µl bzw. 200 µl serum- und antibiotikafreiem Medium und

## 2 Material und Methoden

4 µl bzw. 2 µl Lipofectamine® RNAiMAX Lösung gemischt. Innerhalb der folgenden etwa 20-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur bildeten sich Transfektionskomplexe. Anschließend wurden die Zellen in serumhaltigen aber antibiotikafreiem Medium in die Löcher zu der Transfektionskomplex-Mischung gesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Die Transfektionseffizienz wurde in parallel angesetzten Platten mittels qPCR bestimmt.

### 2.1.3.2 Transfektion von COS-1- und HEK293-Zellen mit Hyaluronsäuresynthase-codierenden Plasmiden

COS-1- und HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für HAS-Proteine mit N-terminaler Fusion mit kleinen Proteinen codierten. Das N-EYFP-*HAS3v2*-Konstrukt wurde von Herrn Dr. Guang Dai zur Verfügung gestellt [3]. Die N-DDK- und N-Hämagglutinin-*HAS3v2*-Konstrukte wurden mit Hilfe des *RapidShuttling Kits (Sgfl/MluI)* (OriGene Technologies, Inc., Rockville, USA) hergestellt. Die Ausgangsprodukte waren Myc-DDK-*HAS3v2* (#RC205784) und pCMV6-AN-DDK (#PS200014) bzw. pCMV6-AN-HA (#PS200013). Die N-EGFP- und N-mCherry-*HAS3v2*-Konstrukte wurden von Frau Petra Rompel durch PCR-Amplifikation der *HAS3v2* aus dem pCMV6-AN-DDK-*HAS3v2* Plasmids und anschließender Klonierung in pEGFR-C1- bzw. pBSKS-MBmCherry-Vektoren hergestellt. Die Plasmidkarten befinden sich im Anhang (s. Abbildung 33). *HAS3v2* wurde von Herrn Ashik Jawahar Deen in den pDendra2-Vector (Evrogen, Moskau, Russland) ligiert. N-EGFP-HAS1,-2 und -3 wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Markku Tammi, Universität von Ost-Finnland, Kuopio, zur Verfügung gestellt.

HEK293-Zellen (Cell Line Service, Eppelheim) und COS-1-Zellen (zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Markku Tammi, Finnland) wurden mit Polyethylenimin (PEI, Sigma-Aldrich), *GeneCellin<sup>TM</sup> Transfection Reagent* (BioCellChallenge, Toulon, Frankreich) und ExGen 500 (Fermentas, Helsinki, Finnland) in antibiotikafreiem *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) transfiziert. In Tabelle 2 sind die verwendeten Konzentrationen sowie die benötigte Inkubationszeit für die Bildung von Transfektionsreagenz-DNA-Komplexen angegeben. Wurden Zellkulturschalen mit einer anderen Wachstumsfläche verwendet, wurden die Mengen entsprechend angepasst.

**Tabelle 2. Transfektionsbedingungen.**

Reagenz, Experiment, Zellen	Fläche [cm <sup>2</sup> ]	Medium [ml]	Medium für DNA- Reagenz- Komplexe [µl]	DNA [µg]	Reagenz [µl]	Inkubation [min]
PEI (1mg/ml), <i>cross-linking</i> , HEK293	9,6	0,66	330	2,2	6,6	30
GeneCellin, Co-IP, HEK293	58	10	500	10	30	15
GenEx 500, FRET, HA-Messung, COS-1	3,9	0,45	100*	2	6	10

\* in steriler 0,9% NaCl-Lösung

PEI: Polyethylenimin, Co-IP: Co-Immunpräzipitation, FRET: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

### 2.1.4 Behandlung der Zellen mit einem MEK-1-Inhibitor

In den Ko-Kultur-Experimenten wurde zur Analyse der möglicherweise beteiligten Signalwege das Medium der Zellen 24 Stunden nach dem Aussäen durch Tumorzell-Medium, versetzt mit dem MEK-1-Inhibitor PD98059 [Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt; gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)], in einer Endkonzentration von 50 µM oder DMSO, ersetzt. Die Zellen wurden nach weiteren 24 Stunden lysiert. Die verwendete Konzentration von PD98059 wurde anhand einer effektiven Reduktion der ERK-Phosphorylierung nach 24 Stunden durch Western-Blot-Analyse ermittelt.

### 2.1.5 Bestimmung der Proliferation in Ko-Kultur

#### 2.1.5.1 Quantifizierungen der KYSE-410-Zellzahl mittels Durchflusszytometrie

Je 25 000 SF, CAF und KYSE-410-Zellen wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten in Mono- oder in Ko-Kultur ausgesät und nach 3 Tagen mit Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco®, Life Technologies™, Paisley, UK) abgelöst. Nach dem Waschen mit PBS und Coulter® Isoton II Diluent (Isoton, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) wurden sie in Isoton aufgenommen und mit 1:10 verdünntem Antikörper für 30 min bei 4 °C inkubiert. Durch spezifische Bindung des CD326 (EpCAM)-PE-Antikörpers (Miltenyi Biotec GmbH) wurden die KYSE-410-Zellen

## 2 Material und Methoden

detektiert und durch Zugabe von *Flow Count<sup>TM</sup> Fluorospheres* (Beckman Coulter, Inc.) am *Gallios<sup>TM</sup> Flow Cytometer* (Beckman Coulter, Inc.) quantifiziert.

### 2.1.5.2 Bestimmung der Fibroblasten-Proliferation in der Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von Fibroblasten in Mono- und Ko-Kultur wurden diese vor dem Aussäen mit 2,5 µM *Cell Trace<sup>TM</sup> CFSE Cell Proliferation Kit* (Molecular Probes<sup>TM</sup>, Life Technologies<sup>TM</sup>, Eugene, USA) in Gibco®DPBS mit 0,1 % BSA inkubiert. In lebenden Zellen wird CFSE zu fluoreszierendem Carboxyfluorescein umgesetzt. Die durch Zellteilung abnehmende Carboxyfluorescein-Floureszenz wurde nach 1-4 Tagen in Kultur am *Gallios<sup>TM</sup> Flow Cytometer* (Beckman Coulter, Inc.) bestimmt. Die Experimente zur Proliferation in Ko-Kultur wurden von Frau Petra Rompel durchgeführt.

### 2.1.6 Behandlung mit Erlotinib und 4-Methylumbelliferon in 2D und 3D *in vitro*-Modellen

Zur Untersuchung des Ansprechens von KYSE-410-Zellen auf die Behandlung mit Erlotinib und 4-MU wurden die Zellen in einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer 12-Loch-Zellkulturplatte in Tumorzell-Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneuert und mit 1 µM Erlotinib (LC Laboratories, Woburn, USA), 300 µM 4-MU-Natriumsalz (Sigma-Aldrich), der Kombination von Erlotinib und 4-MU oder Vehikel (DMSO) versetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen für die Western-Blot-Analyse mit 150 µl zweifach Lysepuffer (Zusammensetzung in Tabelle 8 im Anhang) lysiert und nach Zentrifugation mit den gegebenenfalls im Zellkulturüberstand vorhandenen Zellen vereinigt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach 72 Stunden Behandlung mit 1 ml Gibco®DPBS gewaschen und mit 300 µl Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Tumorzell-Medium abgestoppt und die Zellen nach Mischen durch auf- und abpipettieren in der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen in 6-Loch-Platten nach dem gleichen Protokoll behandelt und nach 24 Stunden Behandlung analysiert.

Neben dem 2D-Zellkulturmodell wurde auch ein 3D-Modell benutzt, in dem die Volumenzunahme der gebildeten multizellulären Tumor-Sphäroide (MCTS) beobachtet wurde und somit auf die Effektivität der Therapie geschlossen werden konnte. Dazu wurden analog zu dem von Friedrich *et al.* beschriebenen Protokoll 3000 KYSE-410-Zellen adhäsionsfrei in 96-Loch-Platten kultiviert [151]. Um die Zelladhäsion zu verhindern wurden die Platten mit 50 µl Agarose [1,5 % (m/V)] überzogen, die in serumfreien Tumorzell-Medium aufgekocht worden war. Nach dem Aussäen in 200 µl Tumorzell-Medium pro Loch wurde die Platte 5 min bei 200xg zentrifugiert und für 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. An Tag

## 2 Material und Methoden

4 begann die Behandlung der geformten MCTS mit 1  $\mu\text{M}$  Erlotinib, 300  $\mu\text{M}$  4-MU-Natriumsalz. An Tag 4, 7, 10 und 14 nach Aussäen wurden mit dem 5x Objektiv am Zeiss Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) Aufnahmen der gebildeten MCTS gemacht. Das Medium wurde an den oben genannten Tagen erneuert bzw. die gebildeten MCTS wurden für die Western-Blot-Analyse lysiert. Ebenso wurden MCTS an Tag 5 lysiert. Je Behandlungsgruppe wurden mindestens drei MCTS angesetzt. Mit Hilfe des *Automatic Measurement Program* der AxioVision Software Version 4.8.20 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) wurde der durchschnittliche Durchmesser  $d$  der MCTS ermittelt. Das Volumen wurde dann mit Hilfe der Formel  $V = \frac{1}{6}\pi d^3$  berechnet.

### 2.1.7 Ermittlung des Kombinations-Index

Um mögliche additive oder synergistische Effekte von Erlotinib und 4-MU zu untersuchen, wurde hier die Methode nach Chou [152] verwendet. Dazu wurden zur Simulation von Dosis-Wirkungskurven oben beschriebene Versuche mit 3-tägiger Behandlung und anschließendem Zählen der Zellen mit folgenden Endkonzentrationen durchgeführt:

Erlotinib: 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$   
4-MU: 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$   
In Kombination: 0,17  $\mu\text{M}$  Erlo + 50  $\mu\text{M}$  4-MU, 0,25  $\mu\text{M}$  Erlo + 75  $\mu\text{M}$  4-MU,  
0,5  $\mu\text{M}$  Erlo + 100  $\mu\text{M}$  4-MU, 1  $\mu\text{M}$  Erlo + 300  $\mu\text{M}$  4-MU,  
2  $\mu\text{M}$  Erlo + 600  $\mu\text{M}$  4-MU

Die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Versuchen wurden zur Simulation der Dosis-Wirkungskurven in Mono- und Kombinationsbehandlung herangezogen, so dass ein akzeptabler Korrelationskoeffizient von  $r > 0,97$  für die Kombination berechnet wurde. Die von Chou und Martin entwickelte CompuSyn-Software [153] bestimmte mit Hilfe der Median-Effekt Gleichung

$$f_a/f_u = (D/D_m)^m$$

(D: Dosis;  $f_a$ : *fraction affected*;  $f_u$ : *fraction unaffected*;  $D_m$ : *median-effect dose*; m: Steigung oder kinetische Ordnung)

die für den jeweiligen Effekt (als *fraction affected*,  $f_a$ ) benötigte Dosis in Monotherapie  $(D_x)_1$  und  $(D_x)_2$  und die Dosis der einzelnen Komponenten in Kombination  $(D)_1$  und  $(D)_2$ , die zur Berechnung des Kombinationsindex (*combination index*, CI), herangezogen wurden:

$$CI = (D)_1/(D_x)_1 + (D)_2/(D_x)_2.$$

## 2 Material und Methoden

Werte von  $CI < 0,1$  charakterisieren nach Chou einen sehr starken Synergismus,  $CI = 0,1 - 0,3$  starken Synergismus,  $CI = 0,3 - 0,7$  Synergismus,  $CI = 0,7 - 0,85$  moderaten Synergismus,  $CI = 0,85 - 0,90$  geringen Synergismus,  $CI = 0,9 - 1,10$  einen nahezu additiven Effekt. Werte von  $CI > 1,10$  zeigen antagonistische Interaktionen an [152].

### 2.1.8 Zellzyklusanalyse mit Propidium-Iodid in der Durchflusszytometrie

Das Verfahren zur Analyse des DNA-Gehalts der Zellen wurde in Anlehnung an Nicoletti [154] durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit 600  $\mu$ l Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und nach Zugabe von 1 ml Tumorzell-Medium in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, bei 250xg 5 min zentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 75  $\mu$ l Natrium-Citrat-Puffer (0,1% Na-Citrat, Carl Roth GmbH, 0,1% TritonX-100, Sigma-Aldrich in Wasser) aufgenommen. Vor der durchflusszytometrischen Analyse mit dem *guava easyCyte*<sup>TM</sup> Durchflusszytometer (EMD Millipore Corporation, Hayward, USA) wurden die Zellen durch Zugabe von 25  $\mu$ l *Guava*<sup>®</sup> *Cell Cycle Reagent* (EMD Millipore Corporation) gefärbt. Die Rohdaten wurden anschließend mit der *ModFit LT*<sup>TM</sup> Software (Verity Software House, Topsham, USA) prozessiert. Zunächst wurden in der Ansicht des Vorwärts-/Seitwärtsstreulichts (*forward scatter*, *FSC* / *side scatter*, *SCC*) die Ereignisse selektiert, die auf Zellen und nicht Debris schließen ließen. Im Anschluss daran wurden Dubletten aus der Analyse ausgeschlossen. Die Software analysierte anschließend die prozentuale Anzahl der Ereignisse unter den *peaks* des Histogramms – Zellen mit einfachem Chromosomensatz fielen unter den *G0/G1-peak* und Zellen mit doppeltem Chromosomensatz unter den *G2/M-peak*. Dazwischenliegend befanden sich Zellen in der S-Phase. Zellen, deren Chromatin im apoptotischen Prozess abgebaut wurde, fielen in die sub-G1-Phase.

### 2.1.9 [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporations-Analyse

Der Einbau radioaktiv markierten Thymidins in DNA-synthetisierende Zellen wurde nach 24-stündiger Behandlung mit 4-MU und Erlotinib quantifiziert. Für die letzten 6 Stunden der insgesamt 24-stündigen Behandlung wurde [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Lösung (Perkin Elmer, Waltham, USA) in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu$ Ci/ml bei einer spezifischen Aktivität von 2 Ci/mmol zugefügt. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und die [<sup>3</sup>H]-Thymidin-haltige DNA mit kalter 0,3 M Perchlorsäure gefällt. Durch 20-minütige Inkubation mit 300  $\mu$ l 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung bei 37 °C wurden die Zellreste lysiert. 250  $\mu$ l des Lysats wurden mit *Rotiszint*<sup>®</sup> *ecoplus scintillation mix* (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) auf 5 ml aufgefüllt und die Radioaktivität wurde mit Flüssigkeitsszintillations-Spektrometrie im Beckman LS 6000 IC mit 3-minütiger Messzeit pro Probe als *counts per minute* (cpm) gemessen. 20  $\mu$ l des Lysats wurden zur Bestimmung des Proteingehalts mit Hilfe des unten beschriebenen *Bio-Rad-Protein-Assays* (Bio-Rad

## 2 Material und Methoden

Laboratories, Inc., München) benutzt. Die gemessenen cpm pro Probe wurden anschließend auf ihren Proteingehalt normiert.

### 2.2 Mikroskopie

#### 2.2.1 Immunzyto- und Immunhistochemie

##### 2.2.1.1 Fluoreszenzfärbung von $\beta$ -Catenin und Zytokeratin-18 auf Zellen

Murine dermale Fibroblasten und KYSE-410-Zellen wurden in einer 24-Loch-Platte auf Deckgläsern in einer Dichte von 10 000 pro Loch ausgesät und nach 24 Stunden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit einem Methanol/Acteon-Gemisch (je 50 %, V/V) für 20 min fixiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen 5 min mit 0,1 % TritonX-100 in PBS permeabilisiert, wieder mit PBS gewaschen und 1 Stunde mit 3 % (m/V) BSA in PBS blockiert. Die Zellen wurden mit den Primärantikörpern anti- $\beta$ -Catenin und anti-Zytokeratin 18 (CK-18) in einer 1:500-Verdünnung in 3% (m/V) BSA in PBS über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit AlexaFluor568-gekoppelten anti-Kaninchen-Sekundärantikörper ( $\beta$ -Catenin) in einer 1:1000-Verdünnung und mit FITC-gekoppelten anti-Meerschweinchen-Sekundärantikörper (CK-18) in einer 1:500-Verdünnung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und mit *Roti®-Mount Fluor Care DAPI* (Carl Roth GmbH) eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Eine Übersicht aller verwendeten Antikörper befindet sich im Anhang (s. Tabelle 9 und Tabelle 10). Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten am Zeiss Axio Observer.Z1 mit dem ApoTome.2-Modul (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

##### 2.2.1.2 Fluoreszenzfärbung von Hyaluronsäure und Zytokeratin-18 auf Zellen

Zur Vorbereitung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von HA und CK-18 wurden die auf Deckgläsern ausgesäten Zellen mit einer Mischung von 3,7 % Formaldehyd, 70 % Ethanol, 5 % konzentrierter Essigsäure in PBS (V/V) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert, mit 0,1 % TritonX-100 in PBS permeabilisiert und nach dem Waschen mit PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 1 % BSA in PBS (m/V) blockiert. Anschließend wurde biotinyliertes HA-bindendes Protein (HABP, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt) in einer 1:250-Verdünnung und anti-CK-18-Antikörper in einer 1:500-Verdünnung in 1 % BSA in PBS (m/V) auf die Deckgläser pipettiert und bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Präparate mit den Sekundärantikörpern FITC-anti-Meerschweinchen (Verdünnung: 1:500 in PBS) und ZyMAX™Cy™5-gekoppeltem Streptavidin (Invitrogen, Frederick, USA, Verdünnung: 1:250 in PBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen wurden sie mit *ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI* (Life Technologies™, Eugene, USA) eingedeckt.

### 2.2.1.3 Fluoreszenzfärbung von Hyaluronsäure, Zytokeratin-18 und $\alpha$ -Glattmuskelaktin auf Tumorgewebe

KYSE-410-Xenografftumore aus NMRI *nude* Mäusen wurden entnommen und in Einbettmedium für Gefrierschnitte (KP-CryoCompound Frozen Tissue Medium, Klinipath BV, Duiven, Niederlande) eingebettet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Mit Hilfe eines Kryostaten (Leica CM1850, Leica Biosystems Nussloch GmbH) wurden Gewebsschnitte von  $10\ \mu\text{m}$  Dicke angefertigt. Diese wurden mit einer etwa  $4^{\circ}\text{C}$ -kalten Mischung aus 95 % Ethanol 5 % konzentrierter Essigsäure (V/V) für 10 min fixiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte eine Avidin/Biotin-Blockierung (Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA) nach Herstellervorschrift und anschließende Blockierung mit einer Lösung aus 10 % fetalem bovines Serum (FCS) und 2 % BSA in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Gewebsschnitte wurden mit anti-CK-18-Antikörper, anti- $\alpha$ SMA-Antikörper in einer Verdünnung von je 1:100 und mit biotinyliertem HAP in einer 1:50-Verdünnung in 1 % BSA in PBS (m/V) bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden sie mit FITC-gekoppeltem anti-Meerschweinchen-Antikörper (CK-18) und AlexaFluor568-gekoppeltem anti-Kaninchen-Antikörper ( $\alpha$ SMA) in einer 1:200-Verdünnung und mit ZyMAX<sup>TM</sup>Cy<sup>TM</sup>5-gekoppeltem Streptavidin in einer 1:50-Verdünnung in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Gewebsschnitte mit *Roti®-Mount Fluor Care DAPI* (Carl Roth GmbH) eingedeckt.

### 2.2.2 Perizellulärer Hyaluronsäuremantel von transfizierten COS-1-Zellen

Der perizelluläre HA-Mantel transfizierter COS-1-Zellen wurde an lebenden Zellen durch 30-minütige Inkubation mit  $1\ \mu\text{g/ml}$  AlexaFluor568- bzw.  $5\ \mu\text{g/ml}$  AlexaFluor647- und -680-gekoppelten HA-Bindekomplex sichtbar gemacht [155] und mit dem einem 40x Öl-Objektiv am Zeiss Axio Observer mit einem Zeiss LSM 700 Konfokalmodul (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen. Zum Teil wurden die Zellkerne mit DRAQ5<sup>TM</sup> (Biostatus Ltd., Leicestershire, UK) in einer finalen Konzentration von  $3\ \mu\text{M}$  angefärbt.

### 2.2.3 Lokalisierung der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b

In transfizierten COS-1-Zellen wurde das ER mit Hilfe des *ER-Tracker<sup>TM</sup> Red dye* (Molecular Probes<sup>TM</sup>, Life Technologies<sup>TM</sup>) und der Golgi-Apparat mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sphingolipiden (Molecular Probes) angefärbt. Zur Markierung der Plasma-Membran wurden die Zellen zusätzlich mit Plasmiden transfiziert, die für mRFP-gekoppeltes R-Pre codierten (*Addgene* Plasmid #17275 von Dr. Sergio Grinstein) [156].

### 2.2.4 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

COS-1-Zellen wurden transfiziert, sodass sie N-mCherry-HAS3b und gleichzeitig EGFP bildeten oder N-EGFP-HAS1, -2 oder HAS3a. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert und in Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich) eingebettet. Die FRET-Effizienz (E) wurde mit dem Verfahren der Photobleichung des Akzeptorfarbstoffs bestimmt. Dazu wurden Aufnahmen mit einem 40x Öl-Objektiv am Zeiss Axio Observer mit einem Zeiss LSM 700 Konfokalmodul gemacht. Ein Teil der Zelle wurde als *Region Of Interest* (ROI) markiert und mCherry mit einem 555 nm-Laser bei 100 % Stärke mit 15 Iterationen geblichen. Es wurden Aufnahmen mit dem 40x Objektiv vor und nach dem Bleichvorgang gemacht. Die Aufnahmen wurden unter Zuhilfenahme eines von Herrn Dr. Anthony Squire geschriebenen Makros für die Software Fiji [157] ausgewertet und E anhand der Intensitäten (I) des Donors (EGFP) vor (prä) und nach (post) dem Bleichen wie folgt berechnet:

$$E[\%] = (I_{\text{post}} - I_{\text{prä}}) \times 100 / I_{\text{post}}$$

Dabei wurde E für jede Zelle berechnet und um die Hintergrund-Fluoreszenz außerhalb der geblichenen ROI korrigiert.

### 2.2.5 Zeitraffer-Mikroskopie zur Bestimmung der Zell-Migration

Die Geschwindigkeit ungerichteter Wanderung von KYSE-410-Zellen und SF in Mono- und Ko-Kulturen wurde durch Auswertung von mikroskopischen Zeitrafferaufnahmen mit dem *Fiji Manual Tracking Plugin* [157] gemessen. Pro Bedingung wurden über 24 Stunden mit dem 5x Objektiv des Zeiss Axio Observers Z.1 und Verwendung des Haltefokus in 10-minütigem Abstand Phasenkontrastbilder aufgenommen. Pro Bedingung wurden mindestens fünf zufällig ausgewählte Zellen verfolgt und die durchschnittliche Geschwindigkeit in  $\mu\text{m}/\text{min}$  berechnet. Für die Wundschluss-Migrations-Analyse wurden Silikon-Einsätze der Firma Ibidi® (ibidi® GmbH, Martinsried) verwendet, die aus zwei Kammern bestehen, die durch einen 500  $\mu\text{m}$ -breiten Steg voneinander getrennt werden. Pro Kammer wurden 20 000 Zellen in 70  $\mu\text{l}$  Medium ausgesät. Nach 24-stündiger Adhäsionszeit wurde der Zelleinsatz entfernt, sodass eine 500  $\mu\text{m}$  breite unbewachsene Fläche zwischen zwei konfluenten Zellrasen entstand. Über weitere 24 Stunden wurde die Geschwindigkeit des Schlusses der zuvor freien Fläche mit dem Zeiss Axio Observer Z.1 in 10-minütigen Abständen verfolgt. Zur Hemmung der Proliferation wurden zusätzlich 5 mM Hydroxyharnstoff (Sigma-Aldrich) in das Medium pipettiert. Mit Hilfe der Zen 2012 Software wurde alle 2 Stunden der Abstand zwischen den Migrationsfronten an zwei Positionen vermessen und die mittlere Migrationsgeschwindigkeit wurde berechnet. Die beiden Positionen wurden so gewählt, dass

sie nach 24 Stunden den kürzesten bzw. den längsten Abstand zwischen den migrierenden Zellfronten aufwiesen. Schlossen sich die Zellfronten vor dem Ende des Experiments, so wurde die mittlere Migrationsgeschwindigkeit bis zu diesem Zeitpunkt berechnet.

### 2.3 Hyaluronsäure- und Proteinanalytik

#### 2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate

Der Gesamt-Proteingehalt von Zelllysaten wurde mit dem *Bio-Rad-Protein-Assay* (Bio-Rad Laboratories, Inc., München) bestimmt. Dieser Assay basiert auf der Bradford-Methode [158], die den Farbumschlag von *Coomassie brilliant blue G-250* nach Interaktion mit kationischen (insbesondere Arginin) und unpolaren Seitenketten der Polypeptidkette quantifiziert [159]. Die Proben wurden im 96-Loch-Format mit einer Standard-Reihe von 0 – 3,6 µg BSA pro Loch in 0,4 µg-Schritten auf dem *Multiskan™ FC Microplate Photometer* (Thermo Scientific™, Shanghai) bei 595 nm Absorption vermessen.

#### 2.3.2 Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration im Mediumsüberstand

Die HA-Konzentration im Mediumsüberstand wurde nach 24 Stunden Kultivierung gemessen. Sie wurde mit dem *Hyaluronic Acid (HA) Testkit* (Corgenix, Westminster, USA) nach Herstellerangaben bestimmt und auf je 25 000 SF bzw. 25 000 KYSE-410 normiert. Das Kit basierte auf der spezifischen Bindung der HA durch in Mikrovertiefungen immobilisiertes HABP. In einem zweiten Schritt wurde die gebundene HA von Meerrettichperoxidase-konjugiertem HABP durch die enzymatische Umsetzung eines Chromophors quantifiziert. Darüber hinaus wurden HA-Standardmengen und eine Leerprobe vermessen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte spektrophotometrisch bei 450 nm auf dem *Multiskan™ FC Microplate Photometer*.

#### 2.3.3 Bestimmung der CCL5- und CCL11-Konzentration im Mediumsüberstand

Die CCL5-Konzentration im Mediumsüberstand wurde in über einen Zeitraum von 48 Stunden konditioniertem Medium der Monokulturen und der Ko-Kulturen mit je 25 000 Zellen pro Zellsorte bestimmt. Es wurde der *RANTES (CCL5) Mouse ELISA* (Abcam®, Cambridge, UK) nach Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden unverdünnt gemessen und die Standardreihe umfasste 0 pg/ml, 0,82 pg/ml, 2,05 pg/ml, 5,12 pg/ml, 12,8 pg/ml, 32 pg/ml und 80 pg/ml CCL5-Konzentrationen.

## 2 Material und Methoden

Die CCL11-Konzentration im Mediumsüberstand wurde mit dem *Eotaxin Single Analyte ELISArray Kit, Mouse* (Qiagen) gemessen. Die Proben wurden 60 Stunden nach Aussaat von je 25 000 Zellen pro Zellart in 1 ml serumfreiem DMEM gewonnen. Davon wurden 100 µl unverdünnt gemessen. Die Standardreihe (ebenfalls je 100 µl) umfasste 0 pg/ml, 15,63 pg/ml, 31,25 pg/ml, 62,5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml CCL11-Konzentrationen.

### 2.3.4 Western-Blot

Zur Quantifizierung der Proteine ERK und AKT, in phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Form, sowie PARP, HAS3b,  $\alpha$ SMA und der Ladekontrolle  $\beta$ -Tubulin wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in zweifach Lyse-Puffer lysiert (s. Tabelle 8 im Anhang). MCTS wurden zusätzlich mit Hilfe eines Ultraschallstabs (Sonifier® B12, Branson Sonic Power Company, Danbury, USA) zerkleinert. Die Proben wurden bei 65 °C 5 min unter Schütteln erhitzt und anschließend durch diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) in Anlehnung an die von Laemmli beschriebene Methode [160] nach ihrer Masse aufgetrennt. Größere Proteine wie PARP wurden in 8 %-igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt,  $\alpha$ SMA, AKT und ERK in 10 %-igen und HAS3b mit 12 %-igen. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 7 im Anhang aufgeführt.

Die durch Elektrophorese bei 140 V mit Puffer aus 3 g/l Tris-HCl (Sigma-Adrich), 14,4 g/l Glycin (Carl Roth GmbH), 1 g/l SDS (Carl Roth GmbH) aufgetrennten Proteine wurden durch das halbtrockene (*semidry*) Elektroblothing-Verfahren im *PerfectBlue™ 'Semi-Dry'*-Elektroblotter (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) vom Acrylamid-Gel auf 0,2 µm Whatman™ Nitrocellulose Membranen (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) übertragen. Dazu wurde ein Puffer aus 3 g/l Tris, 14,4 g/l Glycin und 20 % Methanol verwendet. Um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, wurden die Membranen in 5 % Milch in *Tris-buffered saline/ Tween®20* (TBS/T) (anti-PARP-Antikörper) bzw. 5% BSA in TBS/T (alle anderen Primärantikörper) für 1 Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Blockierte Membranen wurden mit Primärantikörpern in einer 1:1000-Verdünnung in einer Lösung von 3 % Milch bzw. 3 % BSA in TBS/T bei 4 °C über Nacht inkubiert. Der anti- $\alpha$ SMA-Antikörper wurde in einer 1:2000-Verdünnung eingesetzt. Anschließend wurden die Membranen dreimal mit TBS/T gewaschen und mit 1:5000 in TBS/T verdünntem Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Liste der verwendeten Antikörper ist in Tabelle 9 und Tabelle 10 im Anhang zu finden. Die Zusammensetzung von TBS/T befindet sich in Tabelle 11. Nach dreimaligem Waschen wurden die Membranen mit dem *Odyssey infrared imaging system* (LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA) gescannt und die um den Hintergrund

## 2 Material und Methoden

korrigierte integrierte Intensität wurde als Maß für die Menge des von den Antikörpern gebundenen Proteins bestimmt.

### 2.3.5 Co-Immunpräzipitation

HEK293-Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert, sodass sie gleichzeitig N-DDK-HAS3b und N-EYFP-HAS3b oder nur EYFP bildeten. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Immunpräzipitation (IP). Zunächst wurden die Zellen für 15 min bei 4 °C in einer 1%-igen Formaldehyd-PBS-Lösung inkubiert, zweimal mit Proteaseinhibitor-haltigem PBS [1:1000 gesättigte ethanolische Lösung von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Proteaseinhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)] gewaschen und mit 3 ml Triton X-100-Lyse-Puffer (s. Tabelle 8 im Anhang) für 20 min bei 4 °C lysiert. 30 µl wurden für die Western-Blot-Analyse abgenommen, um die Proteinexpression vor der IP zu analysieren. Durch Zentrifugation für 15 min bei 13 000 rpm und 4 °C wurde die nukleäre Fraktion von der Membran- und Zytoplasma-Fraktion getrennt. Der Überstand wurde mit 40 µl Pierce® Protein A/G Agarose-Perlen (Thermo Scientific, Rockford, USA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und unspezifische Agarose-Protein-Bindung anschließend durch Abzentrifugieren der Perlen für 5 min und 2000 rpm bei Raumtemperatur entfernt. Der Überstand wurde bei 4 °C mit 6 µg anti-DDK-Antikörper über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Pierce® Protein A/G Agarose-Perlen hinzu pipettiert und 6 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugieren (5 min, 5000 rpm) und fünfmaliges Waschen mit Proteaseinhibitor-haltigem PBS wurden die durch den Antikörper an die Agarose-Perlen bindenden Proteine aufgereinigt und durch Zugabe von zweifach Lysepuffer unter Schütteln bei 65 °C in Lösung gebracht und die Perlen für 10 min bei 14 000 rpm abzentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung und Detektion der Proteine mittels Western-Blot und anti-EYFP- und anti-HAS3b-Antikörpern.

### 2.3.6 Protein-Quervernetzung

Die durch Transfektion N-Hämagglutinin-HAS3b bildenden HEK293-Zellen wurden mit PBS gewaschen und dann für 5 min bei 37 °C mit 0,1 % Glutaraldehyd (Merck KGaA, Darmstadt) in PBS inkubiert. Durch Zugabe von Tris-HCl-Lösung (pH=7-8) in einer Endkonzentration von 100 mM wurde die Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden anschließend in einer Lösung von 150 mM Tris pH = 6,8, 30 % Glycerol (Carl Roth GmbH), 4 % SDS, 7 % Mercaptoethanol, etwas Bromphenolblau (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg) lysiert und wie beschrieben durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden mit anti-Hämagglutinin- und anti-HAS3b-Antikörpern detektiert.

### 2.4 Genexpressionsanalyse

#### 2.4.1 RNA-Isolation und reverse Transkription

Die Gesamt-RNA wurde mit der Phenol-Chloroform-Methode isoliert [161]. Dazu wurden die Zellen aus 6- und 12-Loch-Platten mit 1 ml PeqGOLD TriFast™ (PEQLAB Biotechnologie GmbH) lysiert in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich) versetzt. Nach Zentrifugation bei 13 000 rpm für 10 min wurde die wässrige Phase abgenommen und zu gleichen Teilen mit 2-Propanol vermischt. Die RNA wurde über Nacht bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde sie durch Zentrifugation bei 4 °C und 13 000 rpm für mindestens 40 min sedimentiert. Sie wurde dann zweimal mit 75 % (V/V) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl RNase-freiem Wasser 5 min bei 65 °C unter Schütteln gelöst. Die Quantität und Qualität der RNA wurden mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) bei 230 nm, 260 nm und 280 nm Absorption bestimmt. 1 µg der RNA wurde mit dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

#### 2.4.2 Quantitative *Realtime*-PCR

Die cDNA wurde mit Hilfe der qPCR auf dem Applied Biosystems 7300 Real-Time-PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) und dem StepOnePlus™ Real-Time-PCR System (Life Technologies™, Singapur) quantifiziert. Je Probe wurden zwei parallele Reaktionsansätze gemessen. Die Ansätze bestanden aus Platinum®SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies™, Carlsbad, USA) mit ROX-Referenzfarbstoff, Primerlösung und cDNA-Lösung. Für die Primer-Lösung wurden Vorwärts- und Rückwärts-Primer zu gleichen Teilen in Wasser gelöst. Die Endkonzentration im Reaktionsansatz betrug je Primer 0,625 µM. Die Primer wurden mit Hilfe der Primer3Plus Software [162] und Primer-BLAST [163] entwickelt oder basieren auf Sequenzen aus der Literatur [117, 164-166]. Alle Sequenzen sind in Tabelle 12, Tabelle 13 und Tabelle 14 im Appendix aufgelistet. Die Endkonzentration der cDNA im Reaktionsansatz betrug 1,25 ng/µl für die Analysen von den KYSE-410-Zellen Ko-Kulturen mit den 4-Hydroxytamoxifen- bzw. ethanolbehandelten Hautfibroblasten und für alle anderen 2,083 ng/µl. Die PCR-Bedingungen wurden nach Herstellervorschrift wie folgt gewählt:

1x 2 min 50 °C  
1x 2 min 95 °C  
40x 15 s 95 °C  
30 s 60 °C

Schmelzkurve: Standardprotokoll des jeweiligen Geräts

## 2 Material und Methoden

Für die Auswertung wurden Ansätze mit großen Abweichungen zwischen den parallelen Ansätzen sowie Ansätze, die mehrere Maxima in der Schmelzkurvenanalyse aufwiesen, von der Analyse ausgeschlossen. Basislinie und Schwellenwert wurden initial von der 7300 Real-Time PCR System RQ Study Software Version 1.4 (Applied Biosystems) bzw. StepOne™ Software Version 2.3 (Life Technologies™) automatisch gesetzt. Die Lage des Schwellenwerts wurde vor der Datenanalyse überprüft und je Experiment pro Primerpaar konstant gehalten. Der Wert, an dem die Fluoreszenz die Schwellenwertlinie überschritt (*quantification cycle, Cq*) wurde zur Berechnung herangezogen. Als endogene Kontrolle diente die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), auf die die Zielgene bezogen wurden. Die relative mRNA-Expression wurde wie folgt berechnet [167]:

$$\Delta Cq = Cq_{\text{Zielgen}} - Cq_{\text{GAPDH}}$$

Rel. Expression bezogen auf die GAPDH =  $2^{-\Delta Cq}$

Alle Werte wurden durch den Mittelwert der Kontrollgruppe dividiert und vor der statistischen Analyse logarithmisch transformiert [168].

### 2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse wurde die *Graph PadPrism 6 Software* Version 6.04 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) verwendet. Zwei Datensätze wurden mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten *Student's t-test* analysiert, mehrere Datensätze mittels *one-way ANOVA*. Anschließend wurden ausgewählte paarweise Vergleiche mit dem *Sidak's multiple comparisons test* durchgeführt. Um zu überprüfen, ob sich die berechneten FRET-Effizienzen von der Kontrolle unterschieden, wurden sie mit der *one-way ANOVA* und *Dunnett's multiple comparisons test* analysiert. Die Wachstumskurven der MCTS wurden mit einer *two-way ANOVA* analysiert. Für Western-Blot-Daten, die auf eine Kontrolle normalisiert wurden (pERK/ERK und pAKT/AKT), wurde der *Kruskal-Wallis test* verwendet. Da die Daten des Wundschluss-Assays nach Kolmogorov-Smirnov nicht normalverteilt waren, wurden sie mit Hilfe des *Kruskal-Wallis test* und dem *Dunn's multiple comparisons test* verglichen. Ebenso wurden die Prozent-Werte der Zellzyklusanalyse mit dem *Kruskal-Wallis test* und dem *Dunn's multiple comparisons test* analysiert. Waren die berechneten p-Werte < 0,05 wurde der Unterschied als statistisch signifikant definiert. Ein Ausreißer wurde mit Hilfe des Grubb's Test identifiziert und alle Daten dieses Versuchsdurchgangs wurden von der Analyse ausgeschlossen (s. Abbildung 22C). Signifikanz-Entscheidungen änderten sich dadurch nicht.

### 3 Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen zu den unter „Zielsetzung“ angegebenen drei unabhängigen Fragestellungen dargelegt. Der erste Teil beinhaltet Untersuchungen zur HAS3-Isoform b, der zweite Teil thematisiert die Rolle der HA in der Interaktion von Fibroblasten und KYSE-410-Zellen. Im letzten Teil sind die Ergebnisse zur Wirksamkeit der Kombination aus dem HA-Synthese-Inhibitor 4-MU und Erlotinib in KYSE-410-Zellen dargestellt.

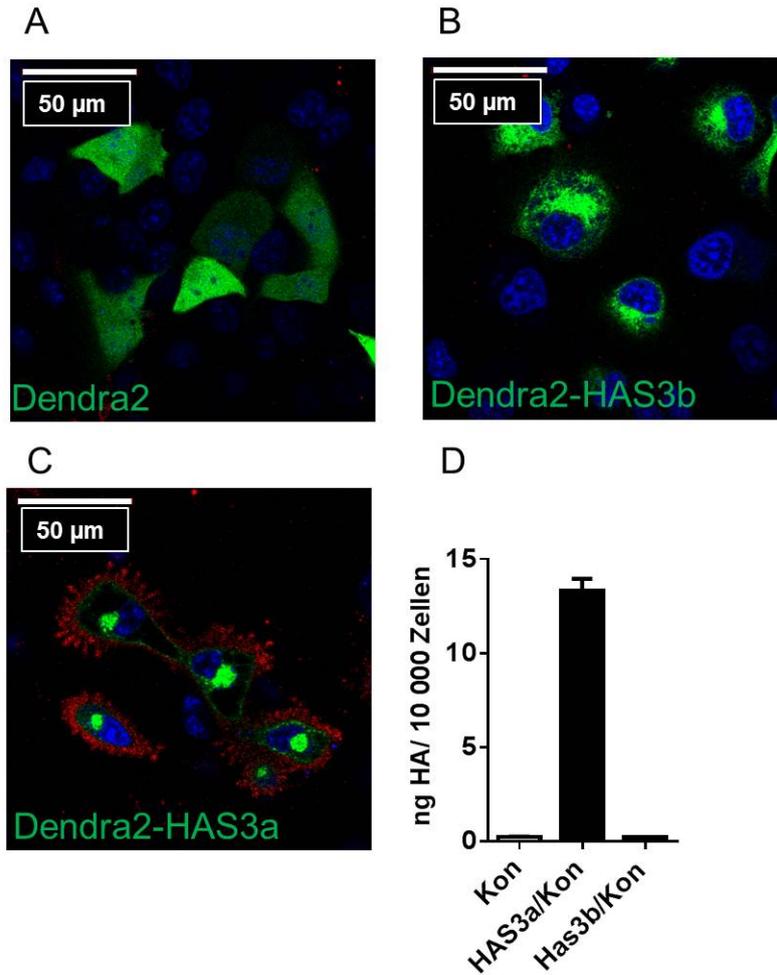
#### 3.1 Charakterisierung der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b

##### 3.1.1 Hyaluronsäuresynthase von Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform a und b in COS-1-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von HAS3b auf die HA-Synthese wurden COS-1-Zellen benutzt. Diese zeichnen sich durch ihre geringe endogene HA-Produktion aus [88] und waren gut geeignet, HAS-Isoformen in verschiedenen Kombinationen zu exprimieren.

Durch Vorarbeiten ist bekannt, dass eine Überexpression von HAS3b in HEK293-Zellen nicht zu erhöhter HA-Konzentration im Zellüberstand führt [3]. Im Gegensatz zu HAS2 und HAS3a, ist HAS3b vermutlich im ER und Golgi lokalisiert [3]. Wie in Abbildung 6 dargestellt, führte Dendra2-HAS3a nach Transfektion zu einem deutlichen perizellulären HA-Mantel in COS-1-Zellen, nicht aber Dendra2-HAS3b. Auch die Konzentration von HA im Medium befand sich nach HAS3b-Überexpression auf Kontroll-Niveau, während die Überexpression von HAS3a zu einem deutlichen Anstieg der HA-Konzentration führte. Da bereits Untersuchungen zur Lokalisation und zur HA-Synthese von HAS3b ausführlich in HEK293-Zellen durchgeführt wurden [3], beschränken sich die hier gezeigten Experimente auf zwei unabhängige Versuchsdurchgänge. Diese zeigten ein ähnliches Bild in COS-1-Zellen im Vergleich zu den bereits beschriebenen HEK293-Zellen.

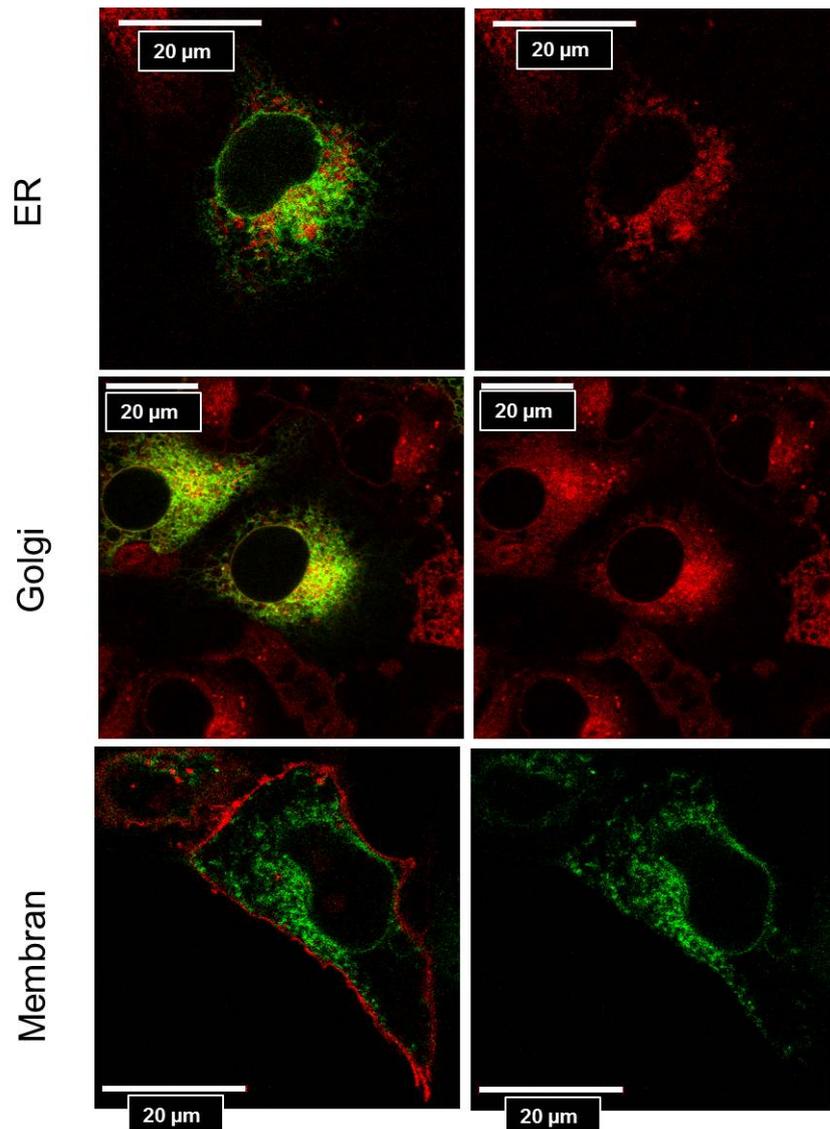
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 6. Hyaluronsäuresynthese in Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform-transfizierten COS-1-Zellen.**

**A**, Perizellulärer HA-Mantel (rot) in COS-1-Zellen, die nach Transfektion Dendra2, **B**, Dendra2-HAS3b und **C**, Dendra2-HAS3a bildeten. Dendra2-Fluoreszenz dargestellt in Grün, Kernfärbung dargestellt in Blau. Repräsentative Aufnahmen. Maßstabsbalken entspricht 50 µm. **D**, HA-Menge im Medium transfizierter COS-1-Zellen bezogen auf die Zellzahl, n = 2.

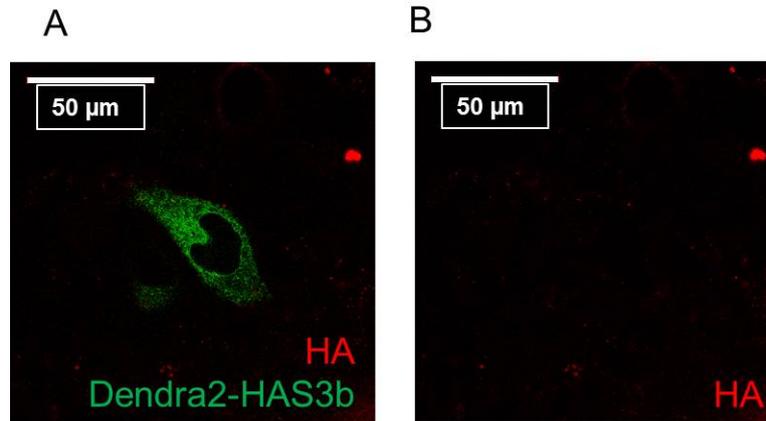
Die Lokalisation von Dendra2-HAS3b ähnelte in den COS-1-Zellen der beschriebenen ER-/Golgi-Lokalisation in HEK293-Zellen (s. Abbildung 7).



**Abbildung 7. Lokalisierung von Dendra2-Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b in COS-1-Zellen.** Repräsentative Aufnahmen von transfizierten COS-1-Zellen. Dendra2-HAS3b dargestellt in Grün, ER-, Golgi- und Membranmarker in Rot. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

### 3.1.2 Stimulation des perizellulären Hyaluronsäuremantels durch Glucosamin

Für HAS1-überexprimierende COS-1-Zellen ist beschrieben, dass sie für die HA-Produktion eine höhere Substratkonzentration benötigen als HAS2- und HAS3-überexprimierende COS-1-Zellen. Erst nach Stimulation mit Glucosamin war ein perizellulärer HA-Mantel deutlich detektierbar [88]. Um zu überprüfen, ob auch HAS3b-überexprimierende COS-1-Zellen einen Zusatz von Glucosamin benötigen, um einen perizellulären HA-Mantel zu produzieren, wurden die transfizierten Zellen 6 Stunden vor der mikroskopischen Untersuchung mit 1 mM Glucosamin stimuliert. In fünf zufällig gewählten Aufnahmen wurde allerdings auch hier keine Bildung eines HA-Mantels mit Hilfe von AlexaFluor568-gekoppeltem HBP sichtbar (s. Abbildung 8).



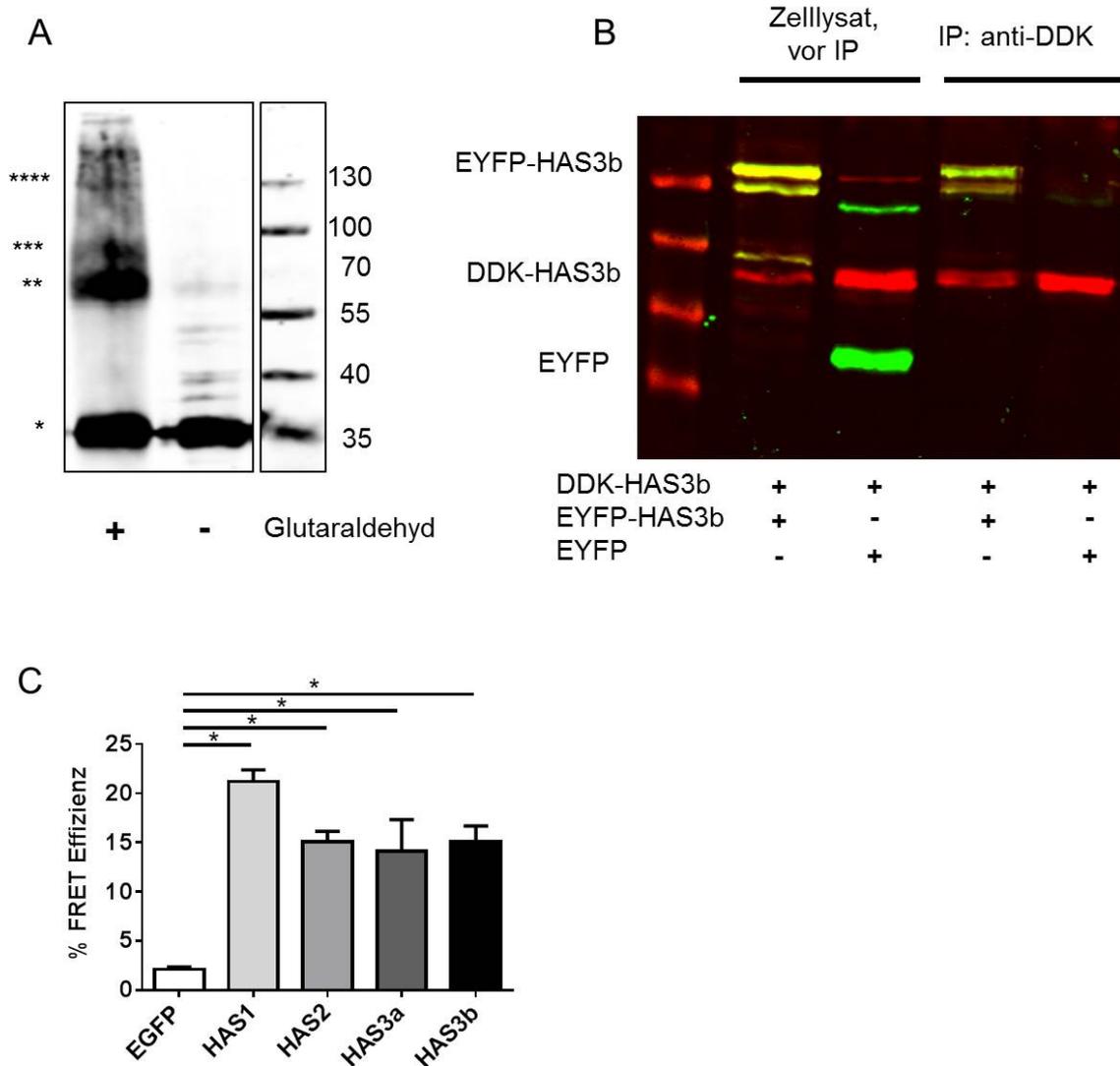
**Abbildung 8. Perizellulärer Hyaluronsäuremantel in Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b-transfizierten COS-1-Zellen nach Glucosamin-Stimulation.**

Repräsentative Aufnahme von Dendra2-HAS3b-überexprimierenden COS-1-Zellen. **A**, Mischbild aus Dendra2-HAS3b in Grün und HA-Färbung in Rot. **B**, HA-Färbung des Bildes. Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

#### 3.1.3 Oligomerisierung der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b

Es wurde außerdem untersucht, ob HAS3b ähnlich wie die aberranten Splicevarianten der HAS1 vermag, Homo- und Heterooligomere zu bilden [70]. Zur Quervernetzung von Proteinen, die miteinander interagieren, wurden transfizierte HEK293-Zellen, die N-Hämagglutinin-HAS3b synthetisierten, mit Glutaraldehyd behandelt. In der anschließenden Western-Blot-Analyse zeigten sich dann neben der erwarteten Bande des monomeren Proteins bei etwa 35 kDa auch Banden höheren Molekulargewichts (s. Abbildung 9A). Die Bande auf der Höhe von etwa 70 kDa, könnte auf eine mögliche Dimerisierung der HAS3b hindeuten, die Bande bei etwa 100 kDa auf mögliche Trimere und die schwache Bande bei etwa 130 kDa auf mögliche Tetramere. Diese Banden konnten sowohl mit einem Antikörper gerichtet gegen das an HAS3b gebundene Hämagglutinin, als auch mit einem Antikörper gerichtet gegen HAS3b detektiert werden.

### 3 Ergebnisse



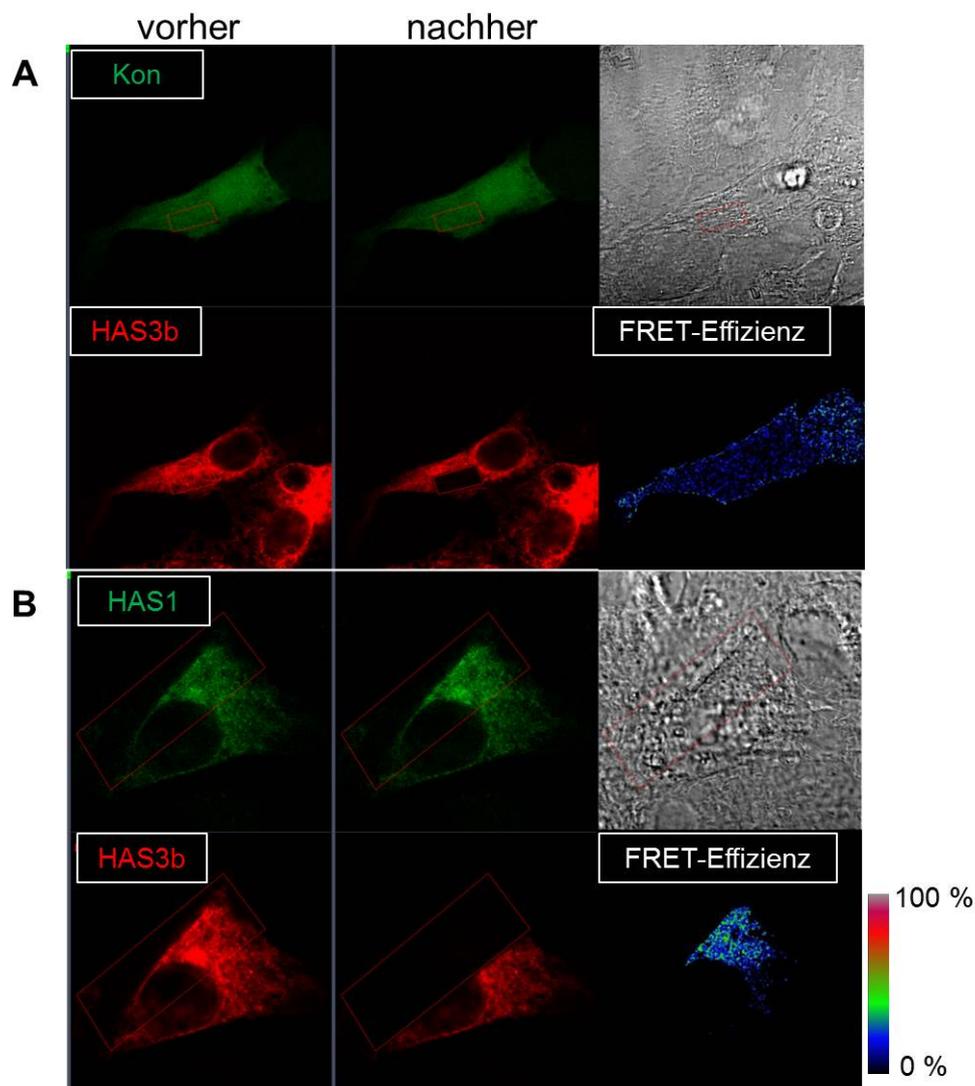
#### Abbildung 9. Oligomerisierung der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b.

**A**, Protein-Quervernetzung mit Glutaraldehyd und anschließende Western-Blot-Analyse. Repräsentativer Blot (anti-HAS3b-Antikörper). \* kennzeichnet mögliche HAS3b-Oligomere. **B**, Repräsentativer Blot der Co-Immunpräzipitation (IP). Gezeigt sind Lysate vor (links) und nach (rechts) der IP mit anti-DDK-Antikörper. Grüne Banden zeigen die Bindung von anti-EYFP-Antikörper, rote Banden die von anti-HAS3b-Antikörper. Gelb ist die Überlagerung der roten und grünen Banden. **C**, FRET-Effizienz in % der Kombination von HAS3b mit jeweils EGFP, HAS1,-2,-3a und HAS3b. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

Durch Co-IP konnte gezeigt werden, dass tatsächlich HAS3b-Homooligomere gebildet wurden. Nach Doppeltransfektion mit Plasmiden codierend für N-DDK-HAS3b und N-EYFP-HAS3b und anschließender IP mit anti-DDK-Antikörper konnte neben der erwarteten Bande von N-DDK-HAS3b auch N-EYFP-HAS3b im Western-Blot detektiert werden. Als Kontrolle wurde das Lysat von N-DDK-HAS3b und EYFP-exprimierenden Zellen verwendet. Nach Co-IP mit anti-DDK-Antikörper konnte kein EYFP detektiert werden (s. Abbildung 9B).

### 3.1.4 Homo- und Heterooligomerisierung der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b

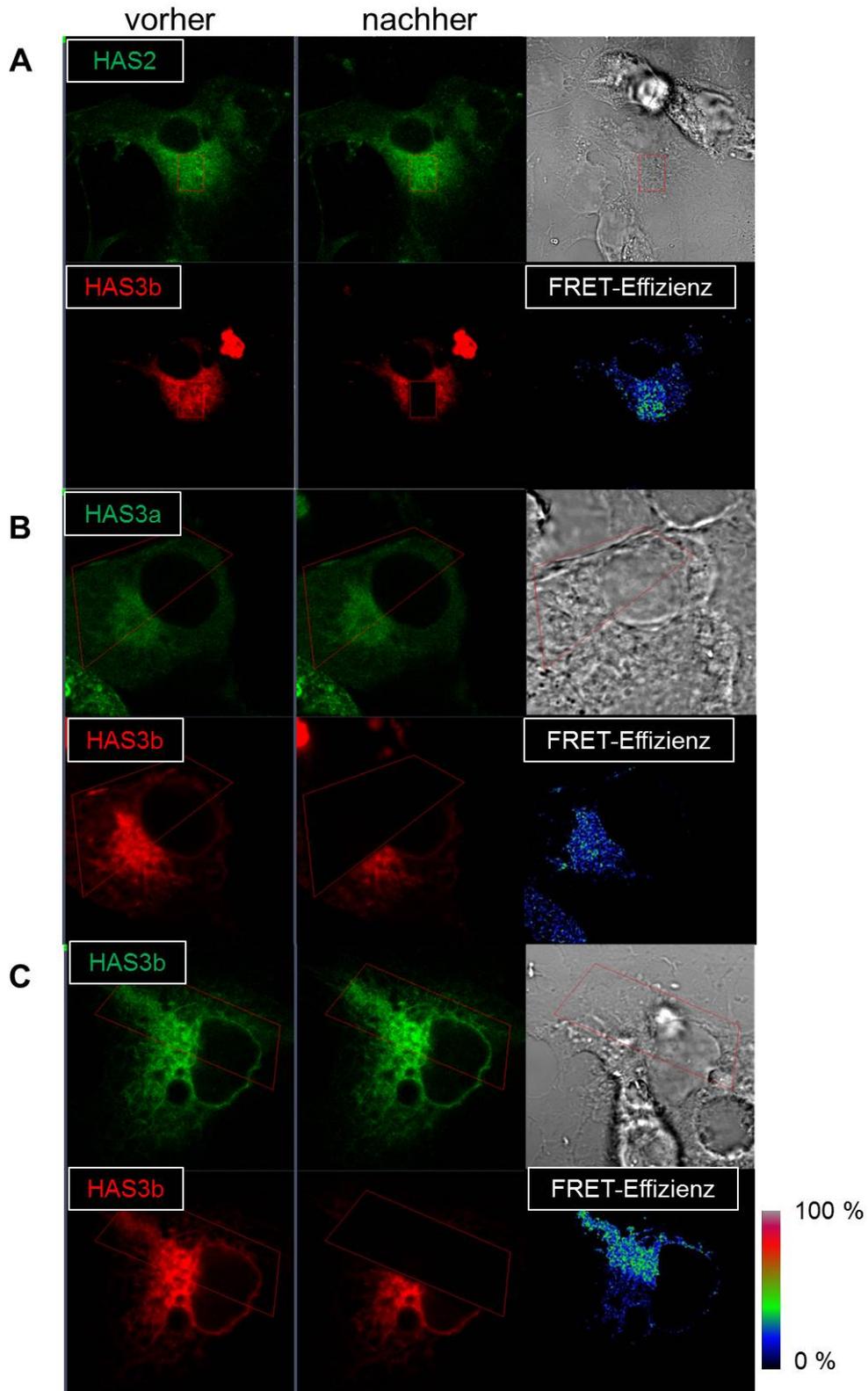
Mit Hilfe von FRET-Experimenten konnte die Bildung von HAS3b-Homooligomeren bestätigt werden. Darüber hinaus wurde mit dieser Methode untersucht, ob HAS3b auch mit anderen HAS-Isoformen Komplexe bildete. Dazu wurden EGFP-, bzw. mit EGFP fusionierte HAS1, HAS2, HAS3a und -b zusammen mit mCherry-HAS3b nach Transfektion in COS-1-Zellen exprimiert (s. Abbildung 10 und Abbildung 11). Im Vergleich zur reinen EGFP-Kontrolle zeigten alle HAS-HAS3b-Kombinationen eine deutliche Zunahme der EGFP-Fluoreszenz nach dem Bleichen von mCherry. Die daraus berechnete FRET-Effizienz war signifikant höher als die der EGFP-Kontrolle. Die FRET-Effizienz in der Kombination aus HAS1 und HAS3b betrug im Mittel über 20 % (s. Abbildung 9C).



**Abbildung 10. EGFP- und mCherry-Fluoreszenz vor- und nach dem Bleichvorgang und Darstellung der FRET-Effizienz.**

Repräsentative Aufnahmen der EGFP (grün) und mCherry-Fluoreszenz (rot) sowie Durchlichtaufnahme und Darstellung der berechneten FRET-Effizienz doppelt-transfizierter COS-1-Zellen. **A**, EGFP/mCherry-HAS3b-exprimierende COS-1-Zellen. **B**, EGFP-HAS1/mCherry-HAS3b-exprimierende COS-1-Zellen.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 11. EGFP- und mCherry-Fluoreszenz vor- und nach dem Bleichvorgang und Darstellung der FRET-Effizienz.**

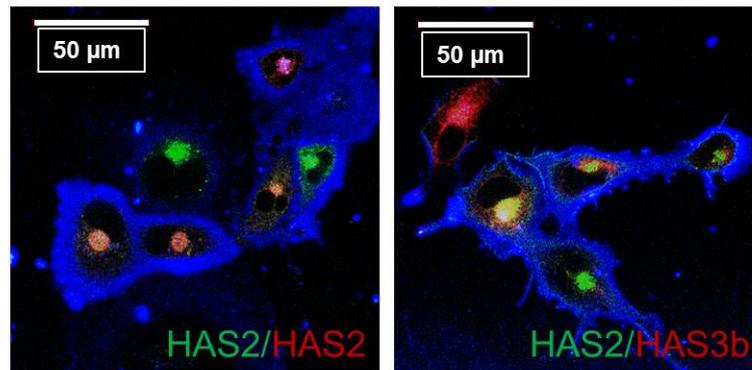
Repräsentative Aufnahmen der EGFP (grün) und mCherry-Fluoreszenz (rot) sowie Durchlichtaufnahme und Darstellung der berechneten FRET-Effizienz doppelt-transfizierter COS-1-Zellen. **A**, COS-1-Zellen exprimierten mCherry-HAS3b in Kombination mit EGFP-HAS2, **B**, EGFP-HAS3a bzw. **C**, EGFP-HAS3b.

### **3.1.5 Einfluss der Heterooligomerisierung auf die Hyaluronsäure-Produktion**

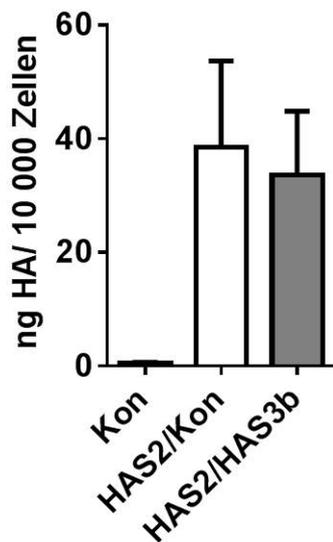
Wie oben gezeigt, interagiert HAS3b mit anderen HAS-Isoformen, synthetisiert selbst aber keine extrazellulär detektierbare HA. Daher wurde untersucht, ob die HA-Produktion von HAS2 und HAS3a durch die Anwesenheit der HAS3b beeinflusst wird. In doppelt-transfizierten COS-1-Zellen wurde der perizelluläre HA-Mantel untersucht und die HA-Konzentration im Überstand gemessen. Wie in Abbildung 12A dargestellt, war trotz Anwesenheit von HAS3b ein deutlicher perizellulärer HA-Mantel in HAS2-überexprimierenden COS-1-Zellen detektierbar. Ebenso deutlich war die HA-Konzentration im Zellüberstand durch HAS2-Überexpression erhöht und durch HAS3b nicht signifikant verändert (s. Abbildung 12B).

### 3 Ergebnisse

A



B

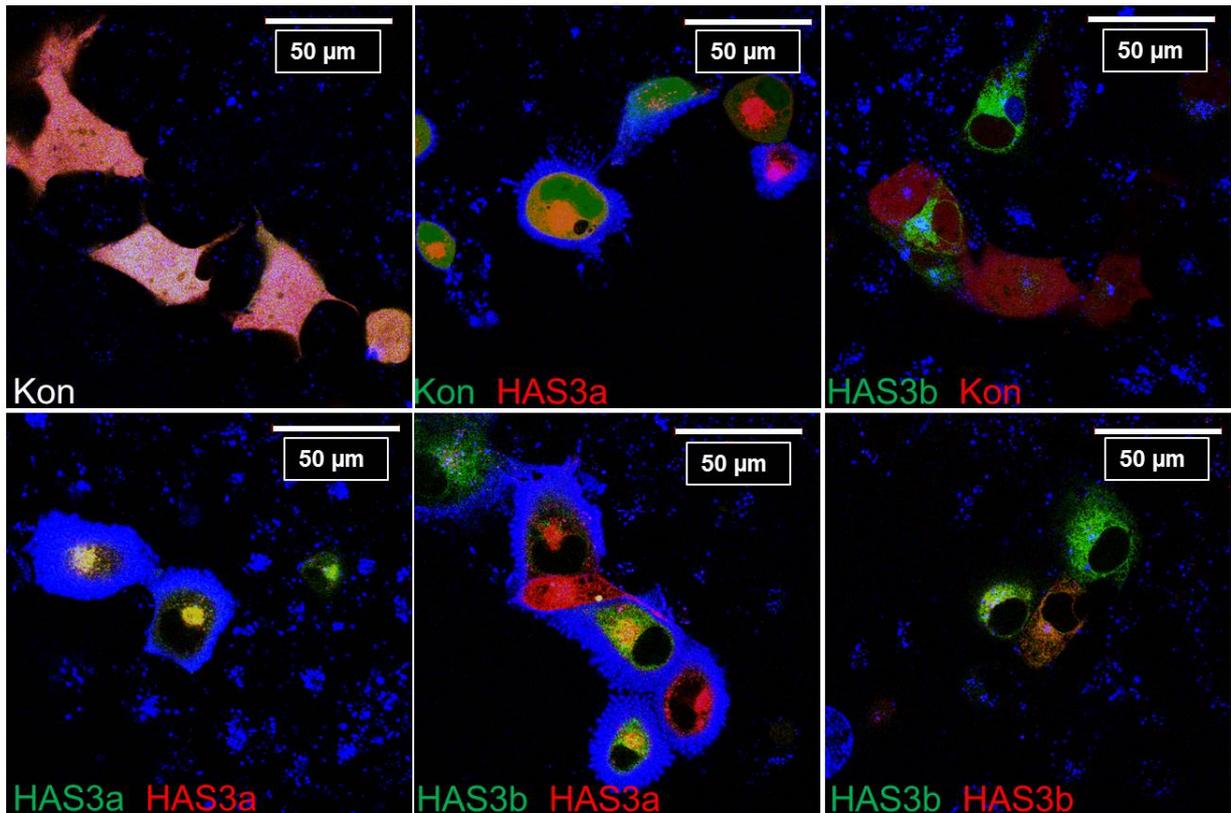


**Abbildung 12. Hyaluronsäuresynthese in Hyaluronsäuresynthase 2- und -3-Isoform b exprimierenden COS-1-Zellen.**

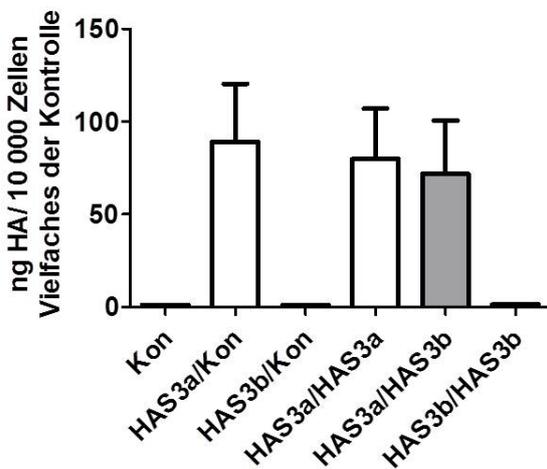
**A**, Repräsentative Aufnahmen des perizellulären HA-Mantels (blau) in transfizierten COS-1-Zellen. Maßstabsbalken entspricht 50 µm. **B**, HA-Menge im Medium transfizierter COS-1-Zellen bezogen auf die Zellzahl, n = 3.

Auch der perizelluläre HA-Mantel sowie die HA-Menge im Überstand gebildet von HAS3a-transfizierten COS-1-Zellen wurden durch HAS3b nicht verändert (s. Abbildung 13).

A



B



**Abbildung 13. Hyaluronsäuresynthese in Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform a und b exprimierenden COS-1-Zellen.**

**A**, Repräsentative Aufnahmen des perizellulären HA-Mantels (blau) in transfizierten COS-1-Zellen. Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m. **B**, HA-Menge im Medium transfizierter COS-1-Zellen bezogen auf die Zellzahl, n = 3.

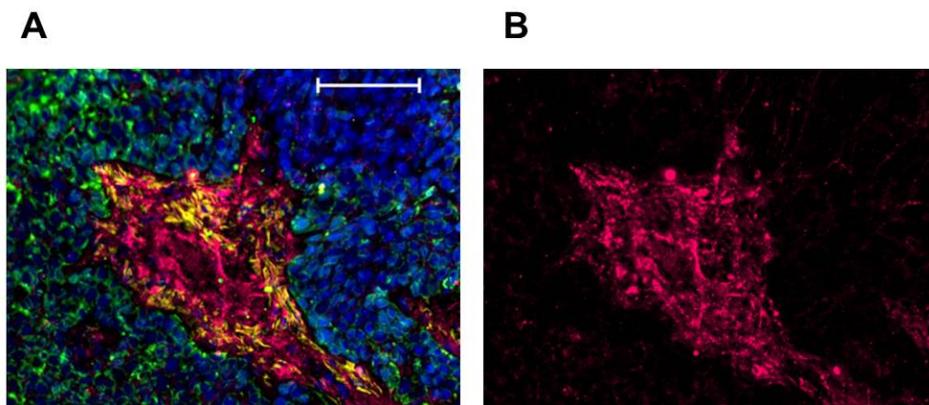
### 3 Ergebnisse

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die kurze HAS3-Isoform, HAS3b, keine extrazelluläre HA synthetisierte, aber Homo- und Heterooligomere mit allen anderen HAS-Isoformen bildete. Diese Oligomerisierung hatte jedoch keinen Einfluss auf die Menge der von HAS2 und HAS3a synthetisierten extrazellulären HA.

## 3.2 Untersuchungen zur Interaktion von KYSE-410-Zellen mit Fibroblasten

### 3.2.1 Hyaluronsäure in KYSE-Xenografftumoren

In histologischen Proben von KYSE-Xenografftumoren wurde eine deutliche HA-Färbung in stromalen Bereichen beobachtet (s. Abbildung 14). Dort waren ebenfalls  $\alpha$ SMA-positive Zellen vorhanden. Diese könnten CAF mit myofibroblastenartigen Eigenschaften darstellen. Auch im Tumorparenchym wurden HA-positive Bereiche detektiert. Insgesamt war dort die HA-Färbung jedoch deutlich schwächer.



**Abbildung 14. Hyaluronsäure in Xenografftumoren.**

**A**, Fluoreszenzfärbungen von HA (magenta), CK-18 (grün),  $\alpha$ SMA (gelb) und Zellkernen (blau) in Xenografftumoren. **B**, Separate Darstellung der Cy5-Fluoreszenz der Aufnahme zur Detektion von HA. Repräsentative Abbildung. Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m.

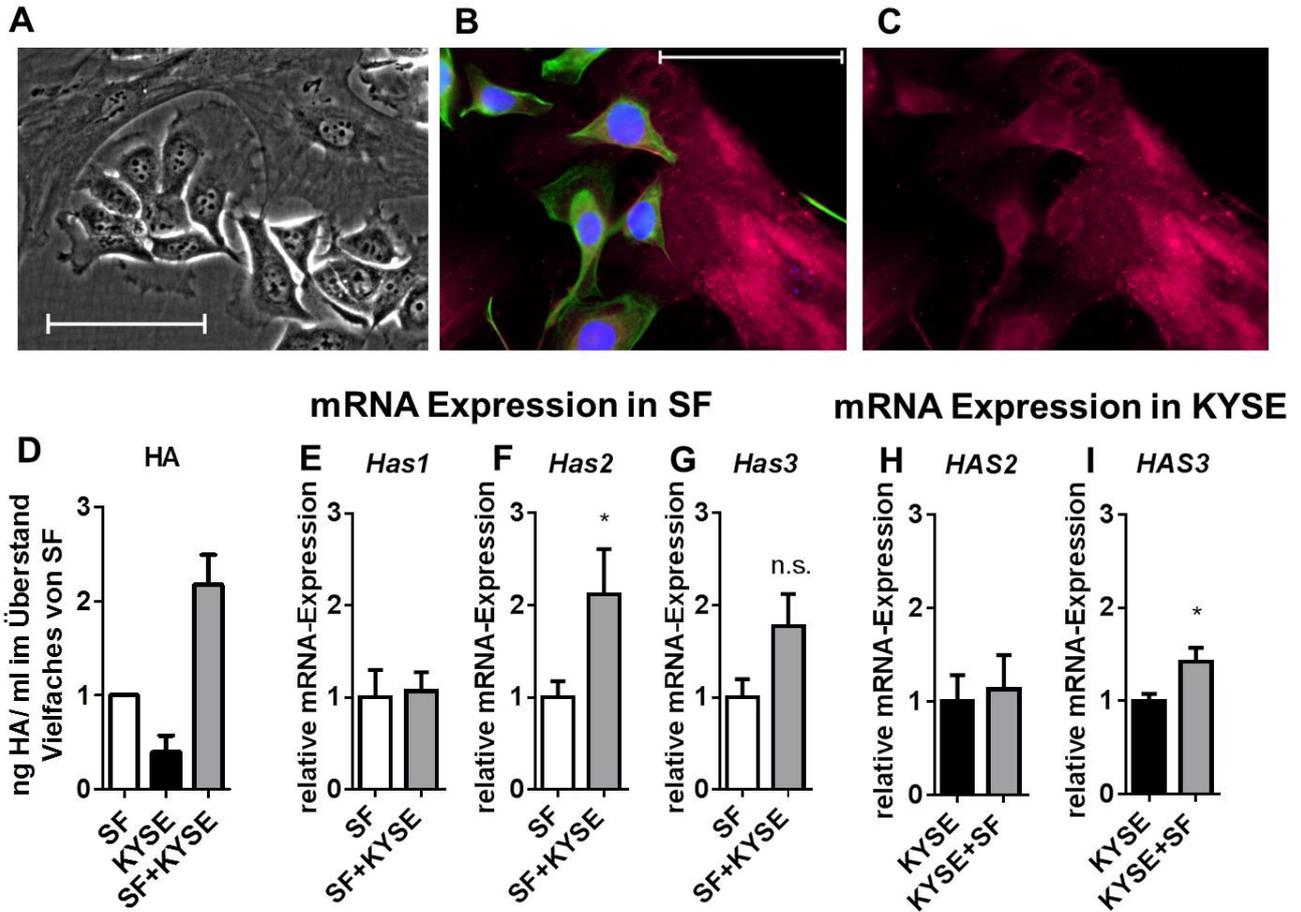
Die folgenden Untersuchungen gingen daher der Frage nach, ob HA durch die Interaktion von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten reguliert wurde und welche Bedeutung HA für das Tumorgeschehen haben könnte. Dazu wurde ein *in vitro* Ko-Kultur-Modell von KYSE-410-Zellen und primären Fibroblasten verwendet. Es wurden sowohl primäre gesunde Hautfibroblasten (SF) als auch aus Xenografftumoren isolierte CAF verwendet. Die Interaktion von KYSE-410-Zellen mit SF diente als Modell für die Konditionierung von gesunden Gewebsfibroblasten zu CAF, während die Ko-Kultur mit CAF die Situation im bereits etablierten Tumor widerspiegeln sollte.

### 3.2.2 Hyaluronsäure in direkten Ko-Kulturen von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten

Wie im Gewebe konnte HA in der direkten Ko-Kultur von KYSE-410-Zellen und SF in beiden Zellarten angefärbt werden (s. Abbildung 15B, C). In Mono- und Ko-Kulturen wurde außerdem die HA-Konzentration im Zellüberstand quantifiziert. Diese erschien in der Ko-Kultur etwas höher als die zusammengenommene HA-Menge, die 25 000 Fibroblasten und 25 000 KYSE Zellen in Monokultur produzieren würden (s. Abbildung 15D). Durch qPCR-

### 3 Ergebnisse

Experimente mit speziesspezifischen Primern wurde eine erhöhte *Has2*-mRNA-Expression in den murinen Fibroblasten durch die direkte Ko-Kultur festgestellt (s. Abbildung 15F). Wie aus Abbildung 15I ersichtlich, kam es in den KYSE-410-Zellen nur zu einer leichten Induktion der *HAS3*-mRNA-Expression.

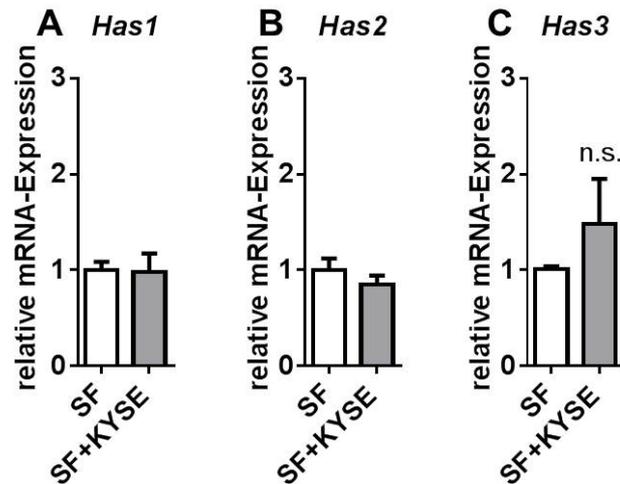


**Abbildung 15. Hyaluronsäuresynthese und Hyaluronsäuresynthase-mRNA-Expression in direkter Ko-Kultur.**

**A**, Repräsentative Phasen-Kontrast Aufnahme der direkten Ko-Kultur von KYSE-410-Zellen und SF. Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m. **B**, Fluoreszenzfärbungen von HA (magenta), CK-18 (grün) und Zellkernen (blau) in SF und KYSE Ko-Kultur. Repräsentative Abbildung. Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m. **C**, Separate Darstellung der Cy5-Fluoreszenz der HA-Färbung. **D**, HA-Konzentration im Überstand von Mono- und Ko-Kulturen normiert auf je 25 000 SF bzw. KYSE-410-Zellen und dargestellt als Vielfaches von SF, n = 4. **E-G**, Murine *Has1-3*-mRNA-Expression in SF nach 24 Stunden in Mono- und Ko-Kulturen, n = 7. **H-I**, Humane *HAS2,-3*-mRNA-Expression in KYSE-410-Zellen nach 24 Stunden in Mono- und Ko-Kulturen, n = 6. Humane *HAS1*-mRNA war in KYSE-410-Zellen unterhalb der Detektionsgrenze. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*p < 0,05, n.s. nicht signifikant.

### 3.2.3 Regulation der Hyaluronsäuresynthese 2-Induktion in Fibroblasten

Um zu prüfen, ob ein direkter Zell-Zell-Kontakt für die Induktion der *Has2*-mRNA in SF nötig war, wurden SF und KYSE-410-Zellen in gemeinsamen Medium, aber räumlich durch einen Steg getrennt, ausgesät. In diesen indirekten Ko-Kulturen konnte keine Induktion der murinen *Has2*-mRNA beobachtet werden (s. Abbildung 16). Ein direkter Zell-Zell-Kontakt war für diesen Effekt unter den gegebenen Bedingungen also notwendig.

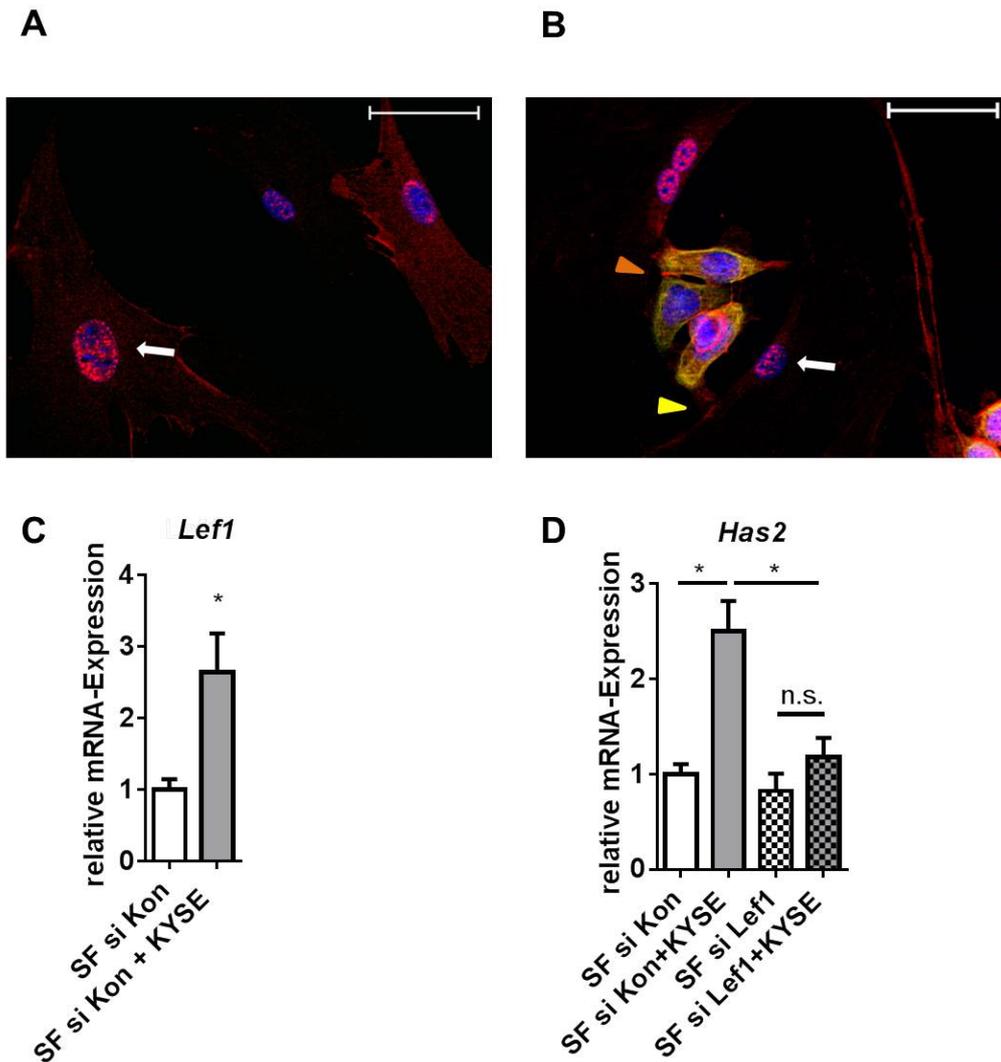


**Abbildung 16. Hyaluronsäuresynthese-mRNA-Expression in indirekter Ko-Kultur.**

**A-C,** Murine *Has1-3*-mRNA-Expression in SF nach 24-stündiger indirekter Ko-Kultur bzw. Monokultur, n = 3 (*Has1*), n = 4 (*Has2,3*). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. n.s. nicht signifikant.

Es wurde zunächst untersucht, ob heterotypische Adhäsionsverbindungen zwischen KYSE-410-Zellen und SF bestanden. Immunzytochemische Färbungen von  $\beta$ -Catenin zeigten vereinzelt positiv gefärbte Bereiche an Berührungspunkten von KYSE-410-Zellen und SF in Ko-Kultur (s. Abbildung 17B).  $\beta$ -Catenin ist auf der cytoplasmatischen Seite von vielen Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakten zu finden. Daher ist es möglich, dass hier einige heterotypische Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte zwischen SF und KYSE-410-Zellen gebildet wurden. Gleichzeitig wiesen SF eine positive  $\beta$ -Catenin-Färbung im Zellkern auf. Kernständiges  $\beta$ -Catenin könnte Zeichen eines aktiven kanonischen Wnt-Signalwegs sein. Nach Stimulation kann  $\beta$ -Catenin in den Zellkern gelangen und bindet an Transkriptionsfaktoren der T-Zell Faktor (TCF)/LEF-Familie, deren Zielgene dann transkribiert werden. In der qPCR-Analyse mit speziesspezifischen Primern konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression des  $\beta$ -Catenin-Interaktionspartners und Transkriptionsfaktors *Lef1* durch die Ko-Kulturbedingungen induziert wurde (s. Abbildung 17C). *Lef1* ist gleichzeitig auch Zielgen der kanonischen Wnt-Signaltransduktion [169]. Wurden SF nun mit si RNA gerichtet gegen *Lef1*-mRNA transfiziert und im Anschluss in Ko-Kultur mit KYSE-410-Zellen gebracht, blieb die Induktion der *Has2* aus (s. Abbildung 17D).

### 3 Ergebnisse



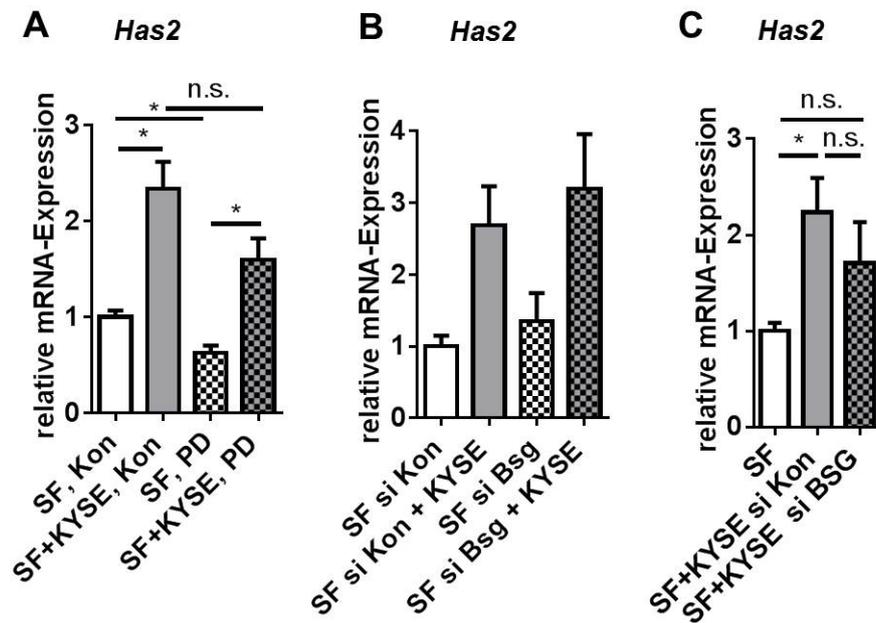
**Abbildung 17. Beteiligung von  $\beta$ -Catenin/LEF1-Signalwegen an der Hyaluronsäuresynthese 2-Induktion.**

**A**, Immunzytochemische Färbung von  $\beta$ -Catenin (rot) in Monokultur. DAPI-Fluoreszenz der Zellkerne in Blau. Der weiße Pfeil zeigt kernständige  $\beta$ -Catenin-Färbung an. **B**, Immunzytochemische Färbung von  $\beta$ -Catenin (rot) und CK-18 (grün) in Ko-Kultur. Die Zellkerne sind blau dargestellt.  $\beta$ -Catenin-positive Bereiche befanden sich an KYSE-KYSE-Kontakten (orangenes Dreieck), an KYSE-SF-Kontakten (gelbes Dreieck) und im Zellkern von SF (weißer Pfeil). Repräsentative Abbildungen. Maßstabsbalken entsprechen 50  $\mu$ m. **C**, *Lef1*-mRNA-Expression in SF nach 24-stündiger Mono- bzw. Ko-Kultur, n = 4. **D**, *Has2*-mRNA-Expression in SF, die zuvor mit Kontroll-si RNA oder si RNA zum *knockdown* von *Lef1* transfiziert wurden, n = 4. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*p < 0,05, n.s. nicht signifikant.

Darüber hinaus wurden andere mögliche Stimuli der *Has2*-Expression untersucht. Es ist bekannt, dass *Has2*-mRNA-Expression über MEK/ERK aber auch über Basigin induziert werden kann [170-173]. Wie in Abbildung 18A dargestellt, konnte der MEK1-Inhibitor PD98059 tatsächlich die *Has2*-mRNA-Expression in der SF-Monokultur reduzieren. Allerdings konnte trotz Anwesenheit des Inhibitors weiterhin ein signifikanter Anstieg der *Has2* durch die Ko-Kultur gemessen werden. Auch der *knockdown* von Basigin in Fibroblasten konnte die *Has2*-Induktion nicht hemmen (s. Abbildung 18B). Allerdings ist die

### 3 Ergebnisse

mRNA-Expression der *Has2* nicht mehr signifikant erhöht, wenn SF mit KYSE-410-Zellen zusammengebracht wurden, deren Basigin-Expression durch si RNA reduziert wurde (s. Abbildung 18C).



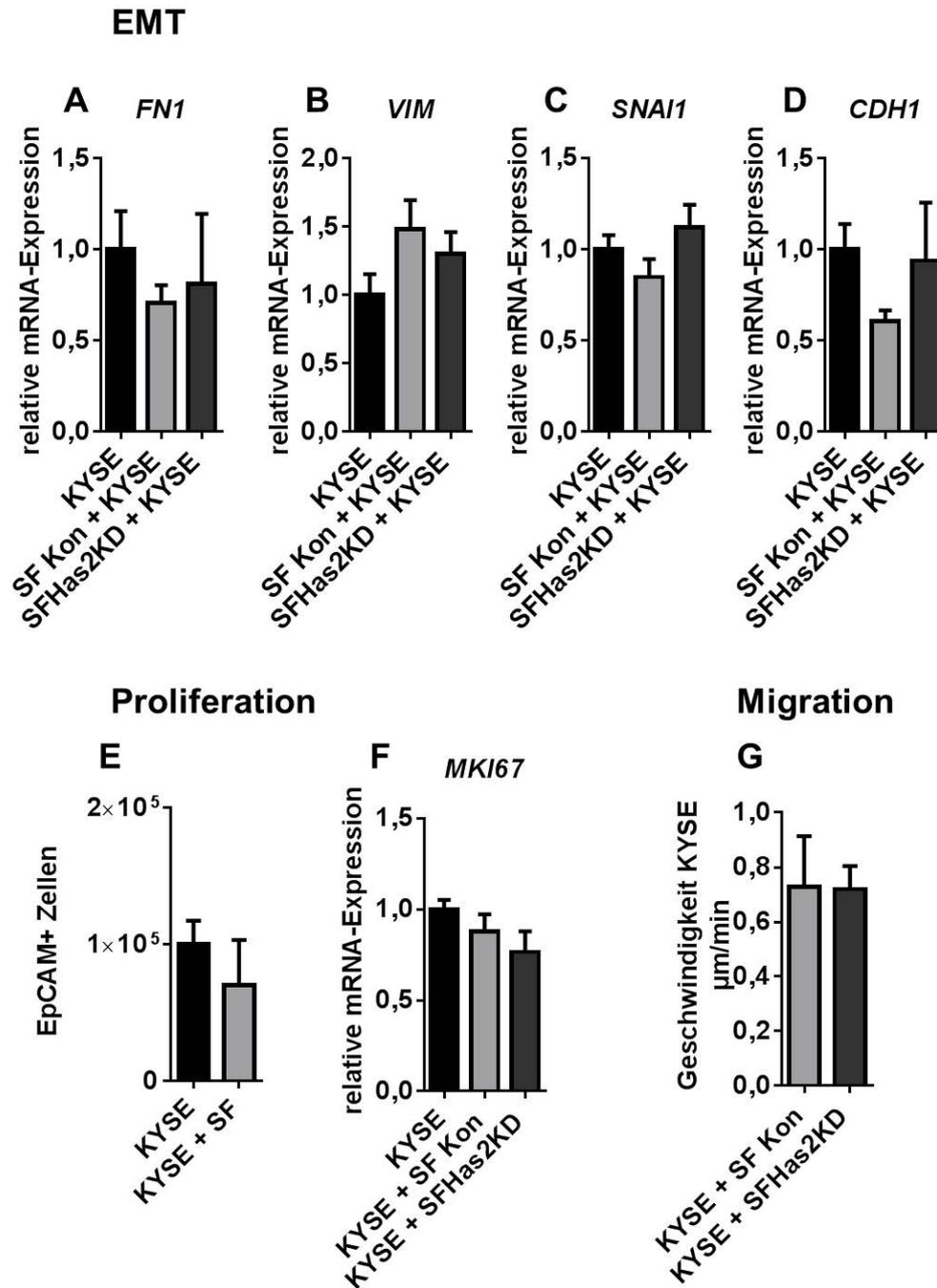
**Abbildung 18. Einfluss von MEK1-Inhibition und Basigin (Bsg)-knockdown auf die Hyaluronsäuresynthese 2-Induktion.**

**A**, *Has2*-mRNA-Expression in SF in Mono- und Ko-Kulturen mit und ohne MEK1-Inhibitor PD98059 (PD), n = 6. **B**, *Has2*-mRNA-Expression in si RNA-transfizierten SF in Mono- und Ko-Kulturen, n = 3. **C**, *Has2*-mRNA-Expression in SF in Monokultur und in Ko-Kultur mit si RNA transfizierten KYSE-410-Zellen, n = 4. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*p < 0,05, n.s. nicht signifikant.

### 3.2.4 Untersuchungen zum Einfluss der von Fibroblasten exprimierten Hyaluronsäuresynthase 2 auf die KYSE-410-Zellen in Ko-Kultur

Da HA bekanntermaßen pro-proliferative und pro-migratorische Signale vermitteln [26, 35, 174] und eine Rolle bei der EMT spielen kann [41, 43, 45, 86], wurde der Einfluss der *Has2*-Induktion in der Ko-Kultur untersucht. Zunächst wurde überprüft, ob sich die Eigenschaften von KYSE-410-Zellen unter Ko-Kulturbedingungen änderten und inwiefern ein *knockdown* der *Has2* in SF einen Einfluss hatte. Zu diesem Zweck wurden primäre murine Hautfibroblasten aus der Linie ROSA26CreER<sup>T2</sup> +/- /HAS2<sup>fllox/fllox</sup> isoliert und *in vitro* ein *Has2*-*knockdown* induziert.

Abbildung 19 zeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen KYSE-410-Zellen in Monokultur und den Zellen in Ko-Kultur hinsichtlich der Expression von EMT-Markern und der proliferativen Eigenschaften bestand. Zur Detektion möglicher EMT wurden Kulturbedingungen gewählt, die zum einen möglichst ausreichend Zeit ließen, um Phänotypveränderung hervorzurufen und zum anderen ein Überwachsen der SF durch die KYSE-410-Zellen in der Ko-Kultur verhinderten. Nach 96-stündiger Ko-Kultur unter Serumentzug konnte jedoch nur ein leichter Trend hin zu weniger E-Cadherin mRNA-Expression durch die Ko-Kultur beobachtet werden (s. Abbildung 19D). Auch nach 48-stündiger Ko-Kultur in serumhaltigem Tumorzell-Medium gab es keine Veränderung der EMT-Marker (s. Abbildung 34 im Appendix). In der Durchflusszytometrie konnte kein Unterschied in der KYSE-Zellzahl im Vergleich von Mono- und Ko-Kulturen detektiert werden (s. Abbildung 19E). Auch die mRNA-Expression von *MKI67*, das von proliferierenden Zellen gebildet wird, war in den Ko-Kulturen nicht signifikant verändert (s. Abbildung 19F). In der Zeitraffer-Mikroskopie wurde die ungerichtete Migrationsgeschwindigkeit zufällig ausgewählter KYSE-410-Zellen gemessen. Hier war die durchschnittliche Geschwindigkeit der KYSE-410-Zellen in Ko-Kultur durch *knockdown* der *Has2* in den Fibroblasten nicht beeinflusst (s. Abbildung 19G).

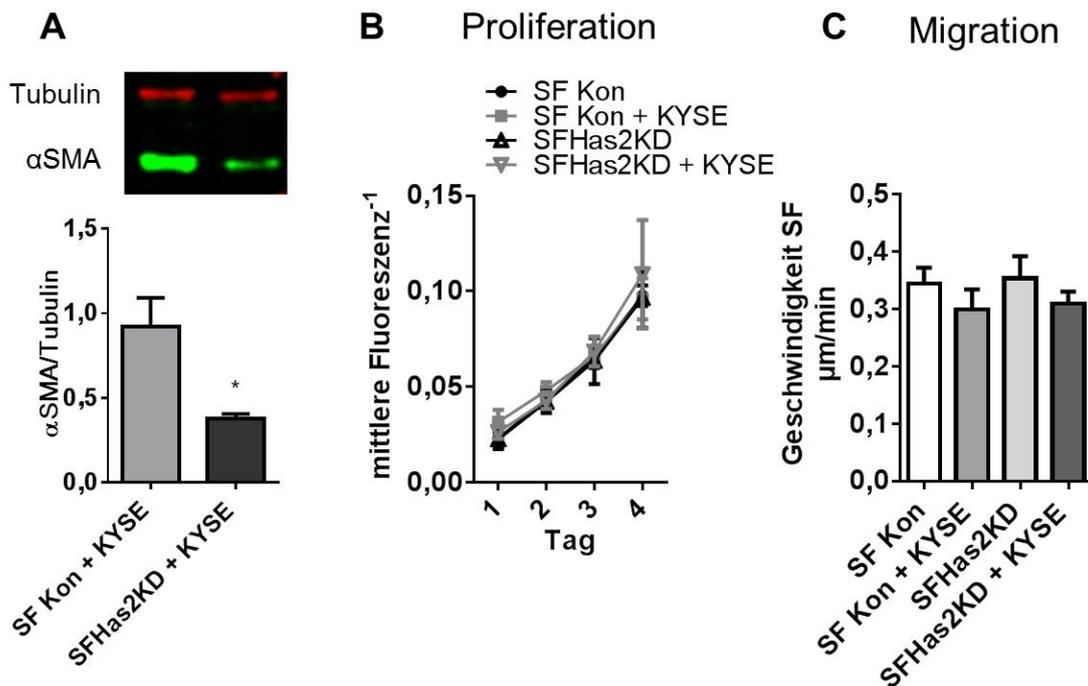


**Abbildung 19. Einfluss der Hyaluronsäuresynthase 2-Expression in Fibroblasten auf den KYSE-Phänotyp in Ko-Kultur.**

**A-D**, mRNA-Expression der mesenchymalen Marker Fibronectin (*FN1*), Vimentin (*VIM*), *SNAI1* und des epithelialen Markers E-Cadherin (*CDH1*) in KYSE-410-Zellen nach 96-stündiger Mono- und Ko-Kultur. Die Ko-Kultur enthielt *Has2-knockdown* Fibroblasten (SFHas2KD) oder Kontroll-Fibroblasten (SF Kon), n = 4. **E**, KYSE-410-Zellzahl bestimmt als EpCAM+-Zellen in der Durchflusszytometrie in Mono- und Ko-Kulturen 3 Tage nach Aussaat, n = 4. **F**, *MKI67*-mRNA-Expression in KYSE-410-Zellen nach 48 Stunden in Monokultur oder Ko-Kultur mit SF Kon bzw. SFHas2KD, n = 3. **G**, Durchschnittliche Geschwindigkeit von KYSE-410-Zellen in Ko-Kultur mit SF Kon bzw. SFHas2KD, n = 3. Gezeigt werden Mittelwerte ± SEM.

### 3.2.5 Einfluss der Hyaluronsäuresynthese 2-mRNA-Induktion auf die Fibroblasten in Ko-Kultur

Weiterhin wurde der Einfluss der *Has2*-mRNA-Induktion auf die Eigenschaften von SF in Ko-Kultur untersucht. In Zelllysaten konnte in den Ko-Kulturen mit *Has2-knockdown* SF eine signifikante Reduktion des Myofibroblasten-Markers  $\alpha$ SMA im Vergleich zu Kontroll-SF-Ko-Kulturen gemessen werden (s. Abbildung 20A). Zur Untersuchung der Proliferation von SF wurden diese mit CFSE inkubiert. CFSE wird in lebenden Zellen zu einem Fluoreszenz-Farbstoff (Carboxyfluorescein) umgesetzt, der durch Zellteilung an Intensität verliert. Der Intensitätsverlust ist daher ein Maß für die Proliferation von Zellen. Die Fluoreszenz-Intensität wurde an unterschiedlichen Tagen in SF Mono- und Ko-Kulturen nach Markierung der Fibroblasten mit CFSE gemessen. Es wurde kein Unterschied im Vergleich von Mono- und Ko-Kultur gefunden sowie kein Unterschied durch den *Has2-knockdown* (s. Abbildung 20B). Auch die ungerichtete Migration der SF, gemessen in der Zeitraffer-Mikroskopie, war weder durch die Ko-Kulturbedingungen noch durch den *Has2-knockdown* signifikant verändert (s. Abbildung 20C).

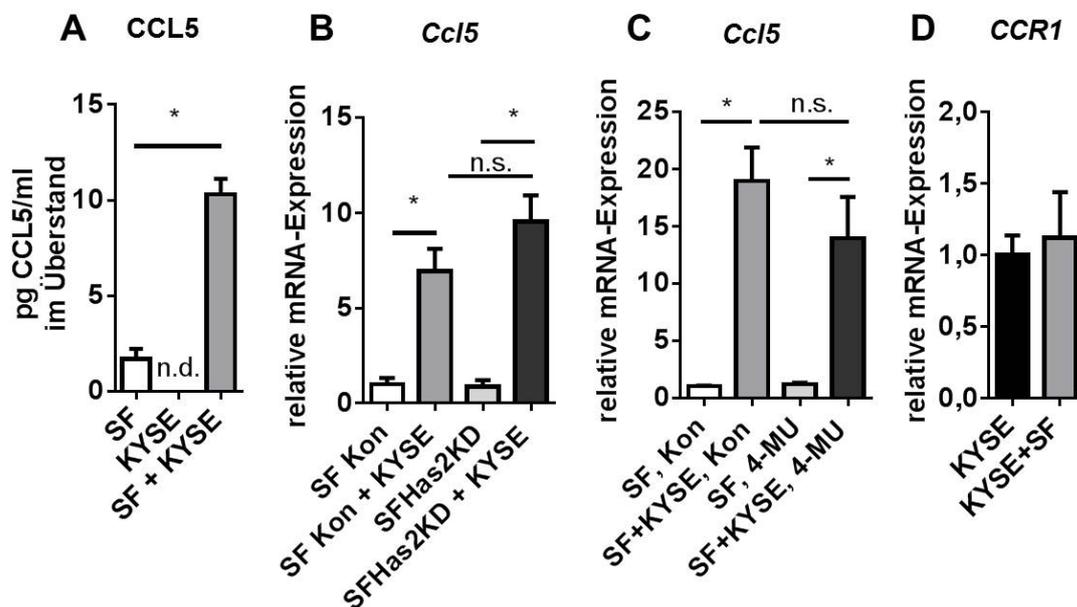


**Abbildung 20. Einfluss der Hyaluronsäuresynthese 2 auf den Fibroblasten-Phänotyp in Ko-Kultur.**

**A**, Repräsentativer Western-Blot und Quantifizierung der  $\alpha$ SMA-Expression in Ko-Kulturen von KYSE-410-Zellen mit *Has2-knockdown* Fibroblasten (SFHas2KD) oder Kontroll-Fibroblasten (SF Kon),  $n = 4$ . **B**, Mittlere Carboxyfluorescein-Fluoreszenz in CFSE-markierten Fibroblasten bestimmt durch Durchflusszytometrie,  $n = 3$ . **C**, Durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von SF in Mono- und Ko-Kulturen,  $n = 3$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.2.6 Chemokinexpression von Fibroblasten in Ko-Kultur

Nicht nur HA und *Has2* waren unter Ko-Kultur Bedingungen erhöht. Auch eine Regulation von Chemokinen wurde beobachtet. So war im Vergleich zum Überstand muriner SF in Monokultur signifikant mehr murines CCL5 im Überstand von direkten Ko-Kulturen muriner SF und humaner KYSE-410-Zellen zu finden (s. Abbildung 21A). CCL5 war sowohl auf Proteinebene als auch in der mRNA-Expression erhöht (s. Abbildung 21A, B). Da wie oben beschrieben, die Expression der *Has2* den Fibroblasten-Phänotyp beeinflusste, wurde getestet, ob HA auch eine Rolle bei der Regulation der Chemokinexpression spielte. Wie in Abbildung 21B zu sehen, war die *Ccl5*-mRNA-Expression nicht nur in Kontroll-SF sondern auch in *Has2-knockdown* SF induziert. Gleichfalls konnte die Induktion auch unter Behandlung mit dem HA-Synthese Inhibitor 4-MU beobachtet werden (s. Abbildung 21C). *Ccl5* wurde in SF folglich unabhängig von HA reguliert. Um beurteilen zu können, ob CCL5 direkte Rezeptor-vermittelte Signalwege in den KYSE-410-Zellen stimulieren könnte, wurde die mRNA-Expression der CCL5-Rezeptoren *CCR1*, -3 und -5 in KYSE-410-Zellen mittels qPCR gemessen. Es konnte keine *CCR5*-mRNA durch qPCR detektiert werden, weder in Mono- noch in Ko-Kultur. *CCR3* war nur in einer der drei Monokulturproben und in keiner Ko-Kultur-Probe nachweisbar. *CCR1*-mRNA wurde zwar in KYSE-410-Zellen exprimiert, aber nicht durch die Ko-Kultur reguliert (s. Abbildung 21D).

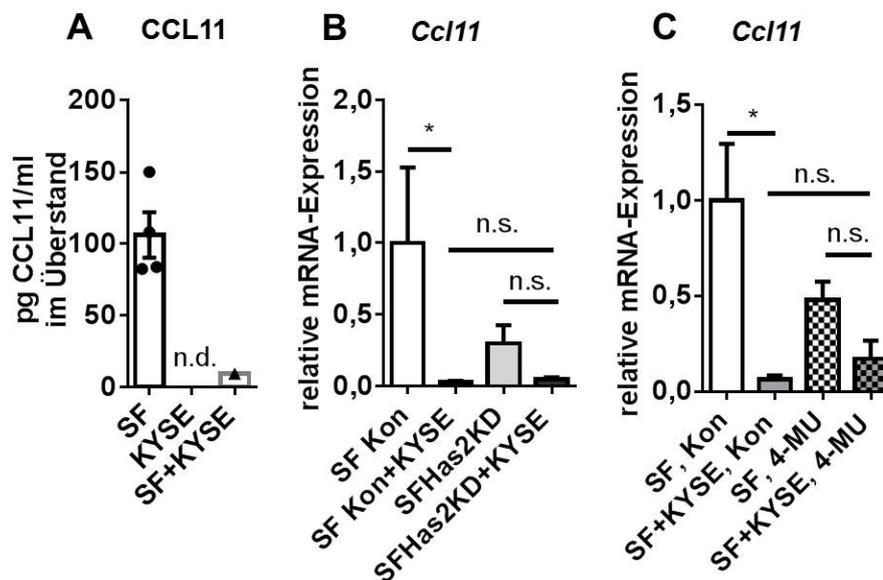


**Abbildung 21. CCL5 in direkter Ko-Kultur.**

**A**, CCL5-Konzentration im Zellkulturüberstand nach 48-stündiger Mono- bzw. Ko-Kultur. Murines CCL5 konnte in KYSE-410-Zellen nicht detektiert werden (n.d.), n = 4. **B**, *Ccl5*-mRNA-Expression in *Has2-knockdown* Fibroblasten (SFHas2KD) bzw. Kontroll-Fibroblasten (SF Kon) nach 48-stündiger Mono- bzw. Ko-Kultur, n = 4. **C**, *Ccl5*-mRNA-Expression in SF nach 48-stündiger Mono- bzw. Ko-Kultur unter Behandlung mit 4-MU oder Vehikel, n = 4. **D**, *CCR1*-mRNA-Expression in KYSE-410-Zellen nach 48-stündiger Mono- bzw. Ko-Kultur mit SF, n = 3. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , n.s. nicht signifikant.

### 3 Ergebnisse

Neben CCL5 fand auch eine Regulation von CCL11 auf mRNA- und Proteinebene statt. In direkter Ko-Kultur wurde die *Ccl11*-mRNA-Expression in SF signifikant reduziert (s. Abbildung 22). Um auch CCL11-Proteine mittels ELISA quantifizieren zu können, wurden die Zellen in serumfreiem DMEM für 60 Stunden kultiviert. Unter diesen Bedingungen konnte in allen vier Versuchsansätzen CCL11 in Medium der SF-Monokultur detektiert werden. Hingegen lag die CCL11-Konzentration in drei von vier Überständen der Ko-Kulturen unterhalb der Detektionsgrenze (s. Abbildung 22A). Die Herabregulation von *Ccl11*-mRNA fand trotz beeinträchtigter HA-Synthese durch *Has2-knockdown* bzw. 4-MU-Behandlung statt. Sie war allerdings nicht mehr statistisch signifikant reguliert (s. Abbildung 22B, C).



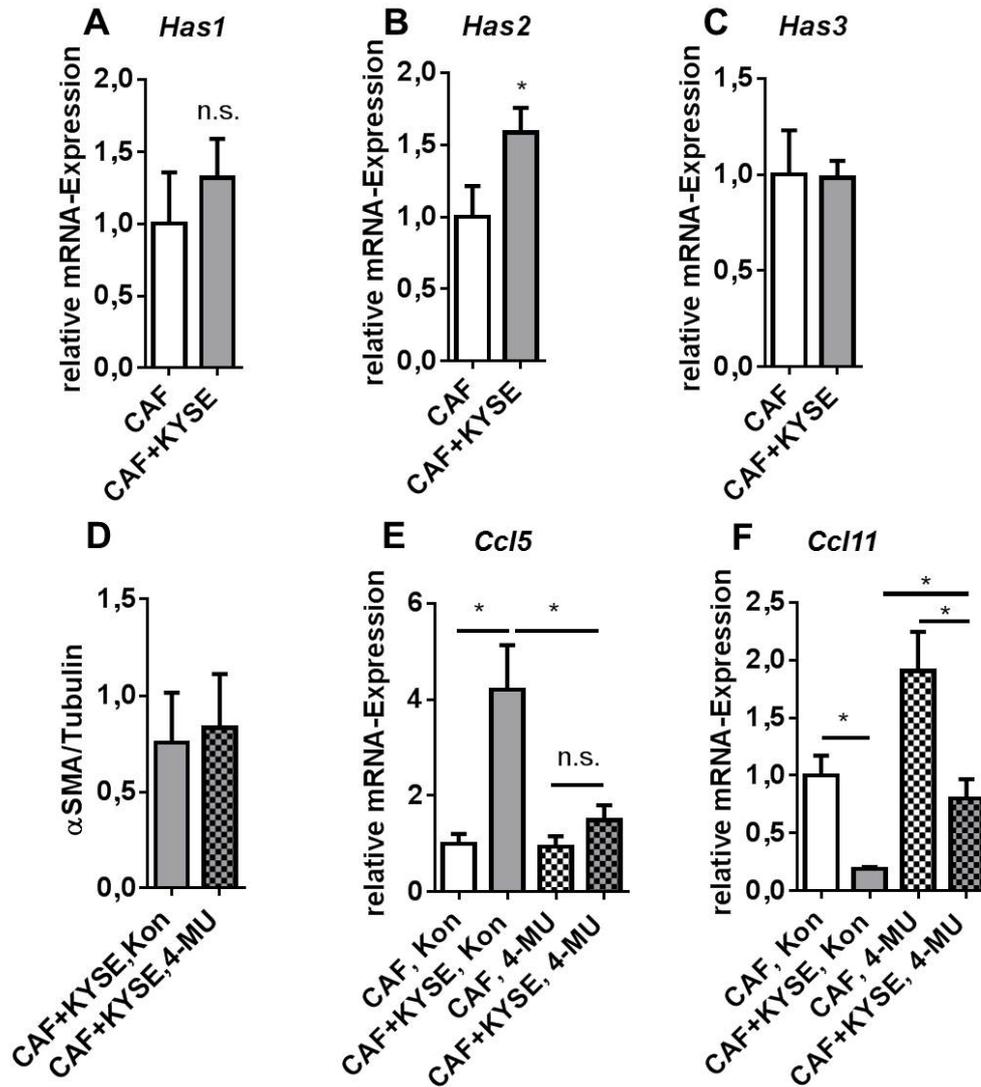
**Abbildung 22. CCL11 in direkter Ko-Kultur.**

**A**, CCL11-Konzentration nach 60-stündiger Mono- bzw. Ko-Kultur. Murines CCL11 konnte in KYSE-410-Zellen nicht detektiert werden (n.d.). **B**, *Ccl11*-mRNA-Expression in *Has2-knockdown* Fibroblasten (SFHas2KD) bzw. Kontroll-Fibroblasten (SF Kon) nach 48-stündiger Mono- bzw. Ko-Kultur, n = 4. **C**, *Ccl11*-mRNA-Expression in SF nach 48-stündiger Mono- bzw. Ko-Kultur unter Behandlung mit 4-MU oder Vehikel, n = 4 (ein unabhängiger Versuchsdurchgang nach Identifizierung eines Ausreißers nach Grubb's Test ausgeschlossen). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , n.s. nicht signifikant.

### 3.2.7 Einfluss der KYSE-410-Zellen auf tumorassoziierte Fibroblasten in Ko-Kulturen

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass durch den direkten Kontakt mit KYSE-410-Zellen normale Hautfibroblasten zur Synthese von HA und CCL5 stimuliert wurden, während sie vermindert CCL11 ausschütteten. Die *Has2*-Expression war assoziiert mit  $\alpha$ SMA-Bildung in den Ko-Kulturen und damit mit einem Myofibroblasten-Phänotyp. Um der Frage nachzugehen, ob diese Prozesse auch in CAF durch den direkten Kontakt mit KYSE-410-Zellen zu beobachten sind, wurden Ko-Kultur-Experimente mit aus Xenografttumoren gewonnenen primären CAF durchgeführt. Auch in CAF konnte eine signifikant erhöhte *Has2*-mRNA-Expression in der direkten Ko-Kultur nachgewiesen werden (s. Abbildung 23B). Im Gegensatz zu SF führte die Hemmung der HA-Synthese nicht zu weniger  $\alpha$ SMA in der Ko-Kultur mit CAF (s. Abbildung 23D). Ähnlich wie in SF waren *Ccl5* und *Ccl11* in Ko-Kulturen mit CAF reguliert (s. Abbildung 23E, F). In CAF jedoch schien die HA-Synthese einen deutlicheren Einfluss auf die Chemokinregulation zu haben. Unter 4-MU-Behandlung war der Anstieg der *Ccl5*-mRNA-Expression nicht mehr signifikant. Ein direkter Vergleich der beiden Ko-Kulturen zeigte eine signifikante Reduktion der *Ccl5*-mRNA-Expression durch die Behandlung mit 4-MU (s. Abbildung 23E). Ebenso war signifikant mehr *Ccl11*-mRNA unter 4-MU-Behandlung in den Ko-Kulturen exprimiert (s. Abbildung 23F). Hier jedoch war trotz 4-MU-Behandlung weiterhin eine Reduktion der *Ccl11*-mRNA-Expression zu finden. Insgesamt schien HA dennoch in diesem Zelltyp einen modulierenden Einfluss auf die Chemokinexpression zu haben.

### 3 Ergebnisse

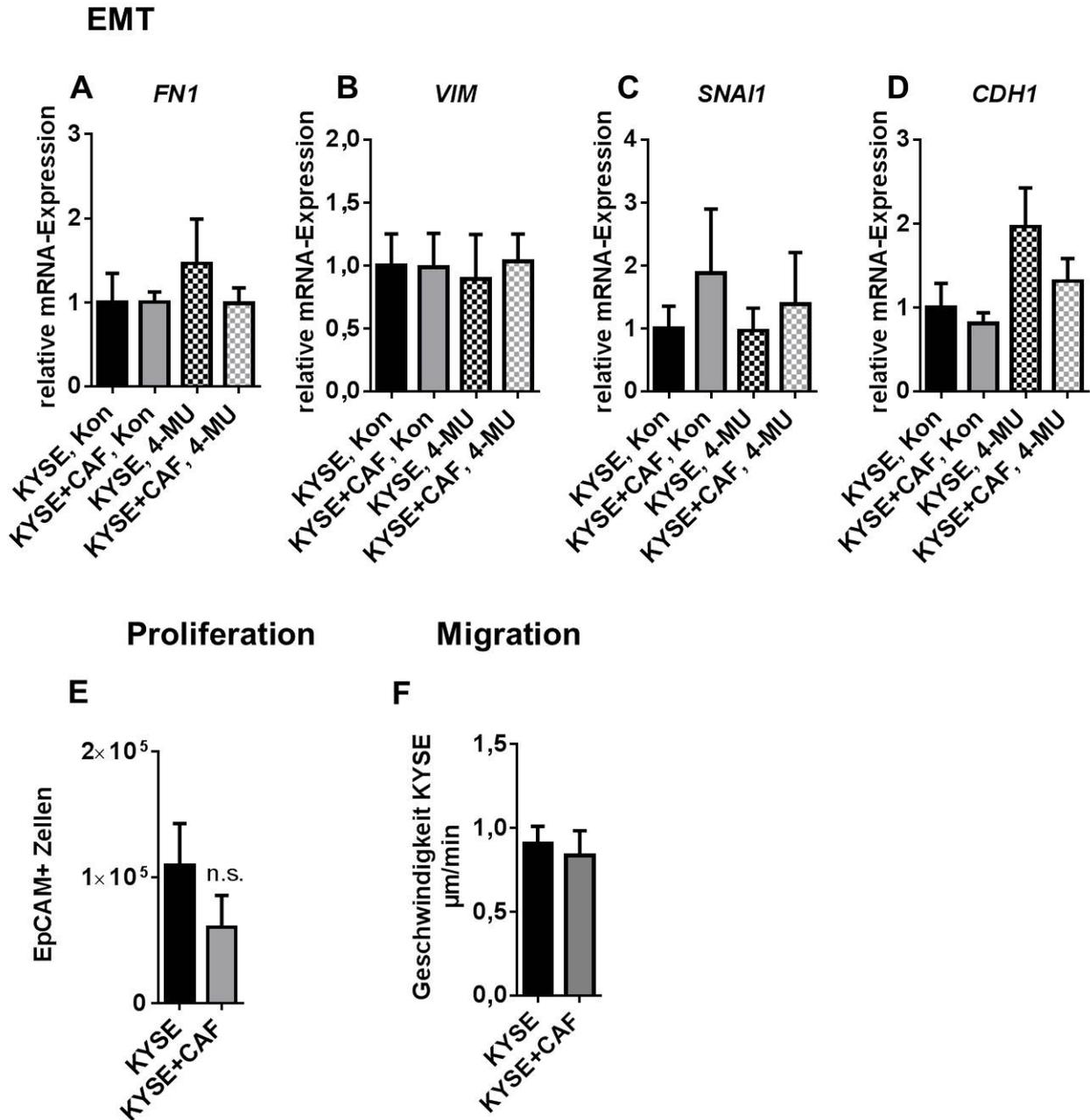


**Abbildung 23. Eigenschaften tumorassoziierter Fibroblasten in direkter Ko-Kultur.**

**A-C**, Murine *Has1-3*-mRNA-Expression in CAF nach 24-stündiger direkter Ko-Kultur bzw. Monokultur, n = 10 (*Has1,-2*), n = 7 (*Has3*, in n = 3 nicht durchgehend exprimiert). **D**,  $\alpha$ SMA in direkten Ko-Kulturen mit CAF und KYSE-410-Zellen, quantifiziert durch Western-Blot, n = 3. **E**, *Ccl5*-mRNA-Expression in CAF nach 48-stündiger Mono- bzw. Ko-Kultur unter Behandlung mit 4-MU oder Vehikel, n = 4. **F**, *Ccl11*-mRNA-Expression in CAF in Mono- bzw. Ko-Kultur mit Behandlung mit 4-MU oder Vehikel, n = 4. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*p < 0,05, n.s. nicht signifikant.

### **3.2.8 Untersuchungen zum Einfluss tumorassoziierter Fibroblasten auf die KYSE-410-Zellen in Ko-Kultur**

In einigen Publikationen wurde gezeigt, dass CAF einen stärkeren Einfluss auf Tumorzellen ausüben können als normale Fibroblasten [175-177]. Daher wurden die Experimente zu Veränderungen von EMT-Markern sowie der Proliferation und Migration der KYSE-410-Zellen in Ko-Kulturen mit CAF wiederholt. Jedoch konnte unter den gewählten Bedingungen kein signifikanter Einfluss der CAF auf die KYSE-410-Zellen festgestellt werden (s. Abbildung 24).



**Abbildung 24. mRNA-Expression von EMT-Markern, Proliferation und Migration in KYSE-410-Zellen in Ko-Kulturen mit tumorassoziierten Fibroblasten.**

**A-D**, mRNA-Expression der mesenchymalen Marker Fibronectin (*FN1*), Vimentin (*VIM*), *SNAI1* und des epithelialen Markers E-Cadherin (*CDH1*) in KYSE-410-Zellen nach 96-stündiger Mono- und Ko-Kultur unter Behandlung mit 4-MU oder Vehikel,  $n = 4$ . **E**, KYSE-Zellzahl bestimmt als EpCAM<sup>+</sup>-Zellen in der Durchflusszytometrie in Mono- und Ko-Kulturen nach 3 Tagen in Kultur,  $n = 5$ . **F**, Durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von KYSE-410-Zellen in Mono- und Ko-Kulturen mit CAF,  $n = 3$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n.s. nicht signifikant.

### 3 Ergebnisse

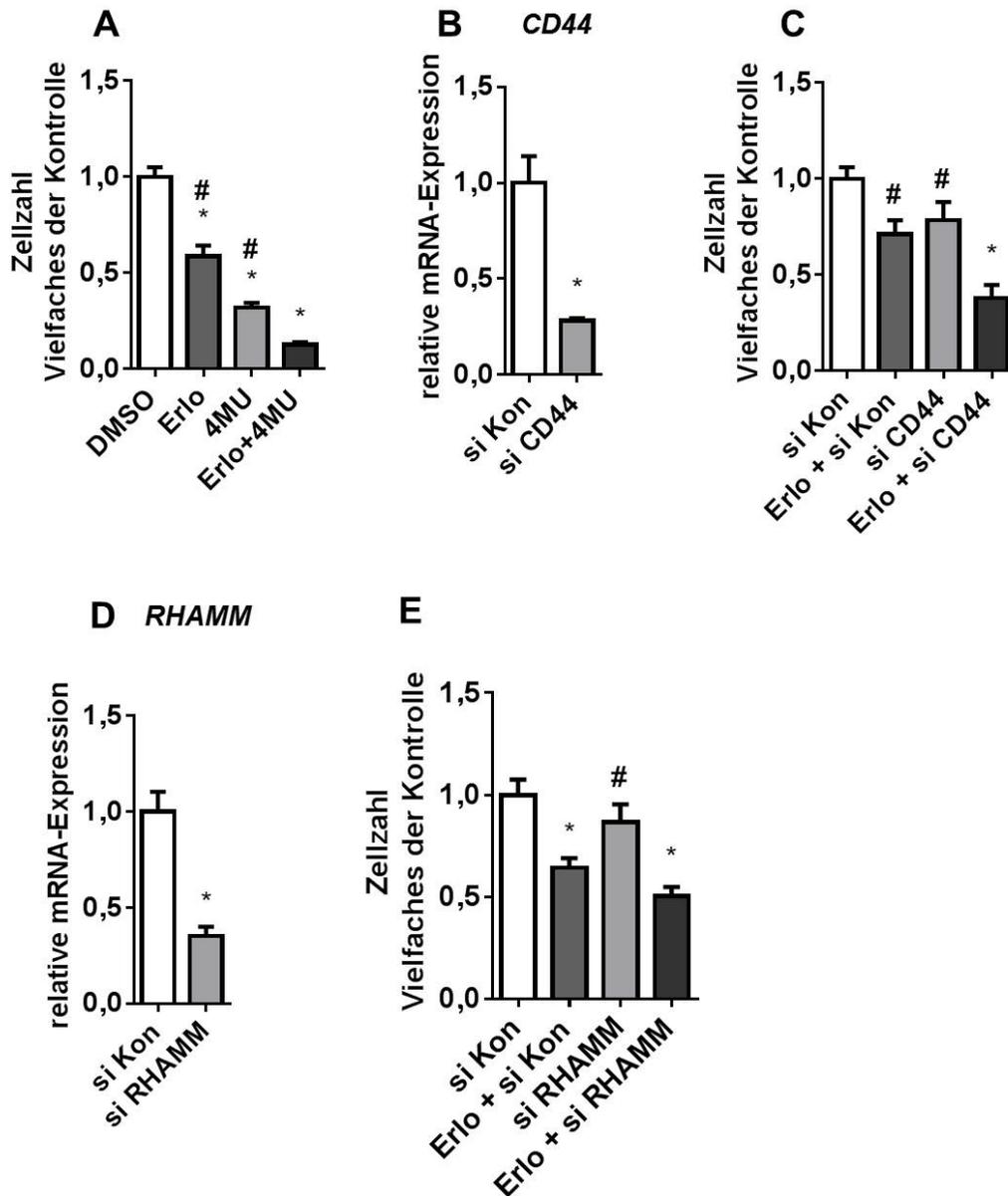
Es kann festgehalten werden, dass KYSE-410-Zellen *Has2*-mRNA in Fibroblasten stimulierten. Die Stimulation war abhängig vom direkten Zell-Zell-Kontakt sowie von der LEF1-Expression in Fibroblasten. Weiterhin wurde auch die Produktion der Chemokine CCL5 und CCL11 in Fibroblasten durch die Ko-Kultur verändert. In Ko-Kulturen mit KYSE-410-Zellen und CAF wurden diese Veränderungen durch Hemmung der HA-Synthese moduliert.

### **3.3 Wirksamkeit der Kombination aus Hyaluronsäure-Synthese-Hemmung und Erlotinib in KYSE-410-Zellen**

#### **3.3.1 Zellzahl nach der Behandlung mit Erlotinib und gleichzeitiger Hemmung von Hyaluronsäure-Signalwegen**

KYSE-410-Zellen wurden für 72 Stunden mit Erlotinib, 4-MU oder beiden Substanzen in Kombination behandelt und anschließend gezählt. Signifikant weniger Zellen befanden sich in den behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle. Außerdem war die Zellzahl unter der Doppelbehandlung signifikant geringer im Vergleich zu Zellen, die nur mit einer Substanz behandelt wurden (s. Abbildung 25A). Um aufzuklären, ob die verminderte Stimulation von HA-induzierten Signalwegen für diesen Effekt verantwortlich war, wurden die Zellen vor ihrer Behandlung mit si RNA gegen die HA-Rezeptoren RHAMM und CD44 transfiziert. Beispielhaft wurde die Transfektionseffizienz mittels qPCR überprüft (s. Abbildung 25B, D). Die Kombination aus der Transfektion mit si RNA gerichtet gegen CD44 und Erlotinib-Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl gegenüber der Kontrolle (s. Abbildung 25C). Außerdem erwies sich diese Kombination auch als signifikant effektiver als eine alleinige Erlotinib-Behandlung und ein alleiniger *knockdown* von CD44 (s. Abbildung 25C). Auch die Kombination aus der Erlotinib-Behandlung und si RHAMM führte zu signifikant weniger Zellen im Vergleich mit der Kontrolle. Allerdings war der Unterschied zur alleinigen Erlotinib-Behandlung hier nicht signifikant (s. Abbildung 25E).

### 3 Ergebnisse



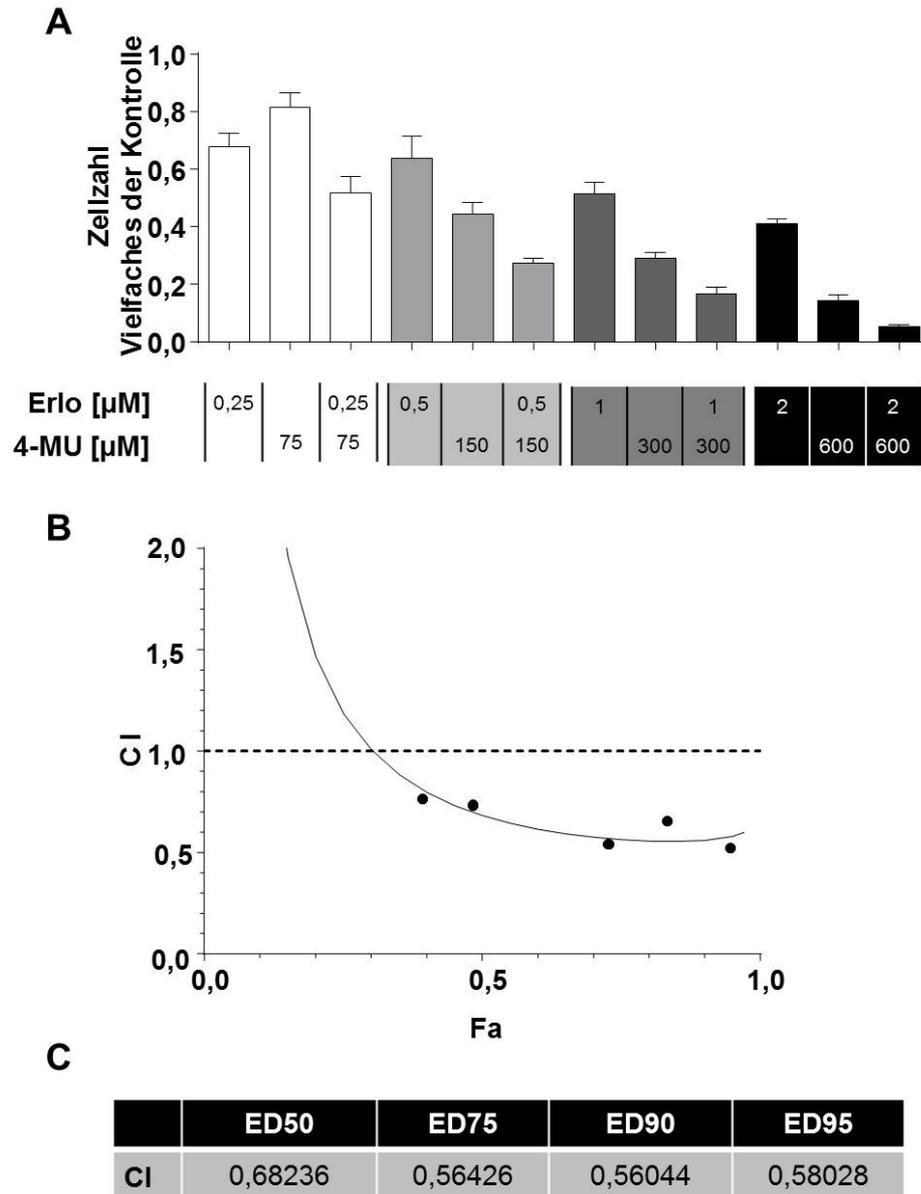
**Abbildung 25. Wirkung von Erlotinib in Kombination mit einer Hemmung von Hyaluronsäure-Signalwegen auf die KYSE-410-Zellzahl.**

**A**, Zellzahl nach 72-stündiger Behandlung mit Erlotinib und 4-MU allein, in Kombination oder mit DMSO, n = 5. **B**, *CD44*-mRNA-Expression von si *CD44* und Kontroll-transfizierten Zellen, n = 3. **C**, Zellzahl nach Transfektion mit si *CD44* oder Kontrolle und anschließender 72-stündiger Behandlung mit Erlotinib oder DMSO, n = 7. **D**, *RHAMM*-mRNA-Expression von si *RHAMM* und Kontroll-transfizierten Zellen, n = 4. **E**, Zellzahl nach Transfektion mit si *RHAMM* oder Kontrolle und anschließender 72-stündiger Behandlung mit Erlotinib oder DMSO, n = 7. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*p < 0,05 gegenüber der Kontrolle, #p < 0,05 gegenüber Erlotinib + 4-MU bzw. si *CD44*/ si *RHAMM*.

### 3.3.2 Synergistische Effekte der Kombination aus Erlotinib und 4-Methylumbelliferon

Um zu evaluieren, ob die beobachteten Effekte auf die Zellzahl auf eine synergistische Wirkung von Erlotinib und 4-MU zurückzuführen waren, wurde die Methode von Chou [152] herangezogen. Dazu wurden KYSE-410-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der Pharmaka sowie deren Kombination in dem Verhältnis 1:300 behandelt und anschließend gezählt (s. Abbildung 26A). Die aus fünf unabhängigen Versuchen erhaltenen Werte für die Wirkung wurden gemittelt um anschließend mit Hilfe des Computerprogramms von Chou und Martin [153] Dosis-Wirkungs-Kurven bzw. *median-effect plots* zu simulieren, die akzeptable Korrelationskoeffizienten von  $r > 0,97$  aufwiesen. Die Korrelationskoeffizienten betragen  $r = 0,991$  für Erlotinib,  $r = 0,985$  für 4-MU und  $r = 0,994$  für die Kombination. Die Kombination zweier Wirkstoffe wird als synergistisch definiert, wenn der berechnete CI  $< 1$  beträgt. Es gibt darüber hinaus eine detailliertere Einteilung; eine Interaktion ist „synergistisch“, wenn die CI-Werte zwischen 0,3 und 0,7 liegen und „moderat synergistisch“, wenn diese zwischen 0,7 und 0,85 liegen. In den hier dargestellten Experimenten war die Interaktion von Erlotinib und 4-MU für *fraction affected* ( $F_a$ )  $\geq 0,5$  als „synergistisch“ zu bewerten. Bei der Kombination von Erlotinib und 4-MU lag der CI-Wert der effektiven Dosis (ED)<sub>95</sub> bei 0,58. Dieser Wert fällt in den Bereich, der Synergismus definiert (s. Abbildung 26B, C).

### 3 Ergebnisse



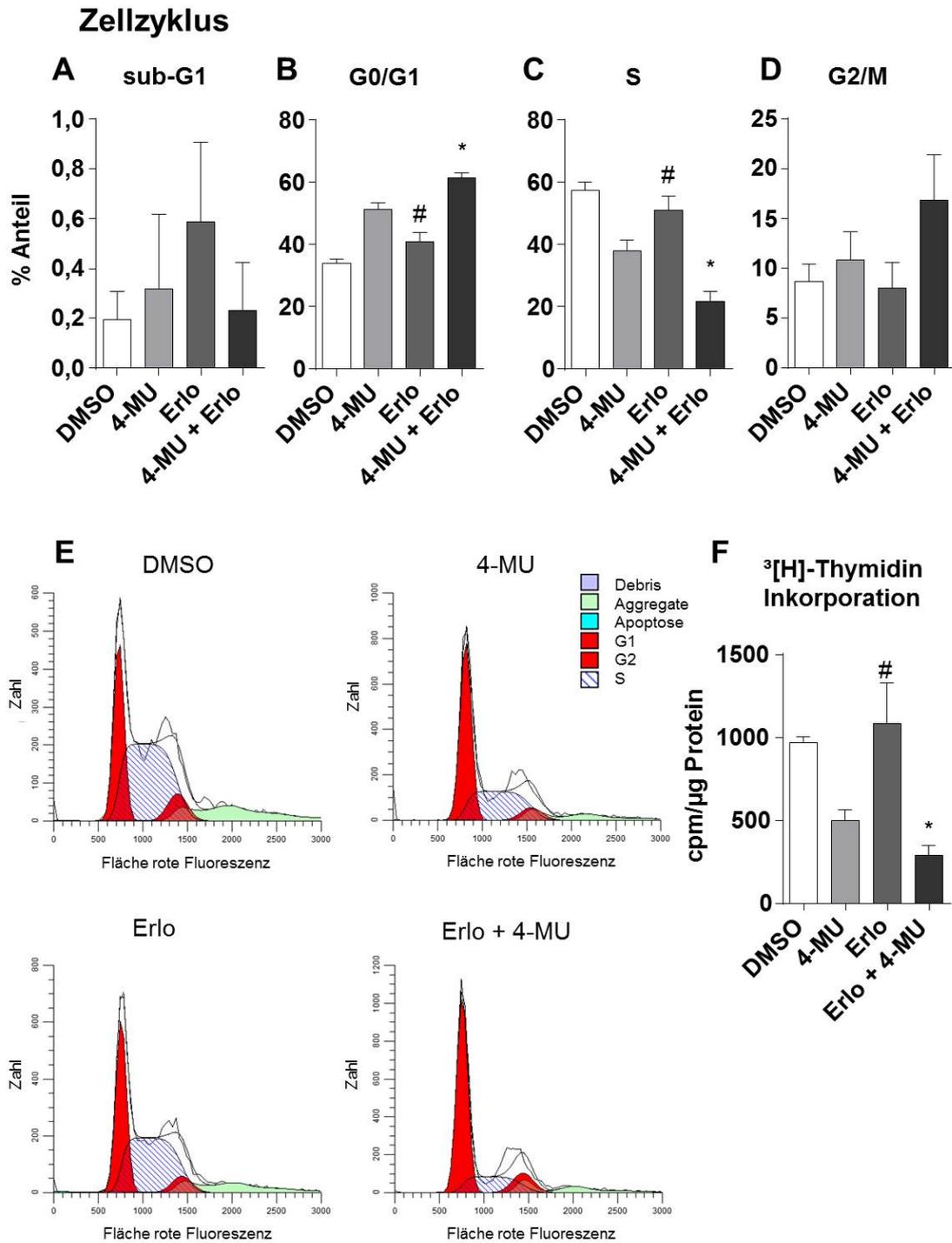
**Abbildung 26. Synergistische Wirkung von Erlotinib und 4-Methylumbelliferon auf die KYSE-Zellzahl.**

**A**, Zellzahl nach 72-stündiger Behandlung mit Erlotinib und 4-MU allein oder in Kombination, dargestellt als Vielfaches der DMSO-behandelten Kontrolle, n = 5-10. **B**, Dargestellt sind experimentell ermittelte CI-Werte (●) und durch Kurvenanpassung simulierte CI-Werte in Abhängigkeit der Fa. **C**, Berechnete CI-Werte für gesetzte ED.

### **3.3.3 Anti-proliferative Effekte von Erlotinib und 4-Methylumbelliferon**

Ferner wurde analysiert, ob die reduzierte Zellzahl unter Behandlung mit Erlotinib und 4-MU auf anti-proliferative oder auf apoptotische Prozesse zurückzuführen war. Dazu wurde der DNA-Gehalt der Zellen durch Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Der Anteil der Zellen in der S-Phase war nach Doppelbehandlung signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert. Entsprechend war verglichen mit der Kontrolle ein höherer Anteil von Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase nach Doppelbehandlung zu finden (s. Abbildung 27B, C, E). Es konnte kein signifikanter Anstieg des Anteils der Zellen in der sub-G<sub>1</sub>-Phase festgestellt werden. Daher wurde die beobachtete reduzierte Zellzahl vermutlich nicht durch eine induzierte Apoptose, als vielmehr durch eine Reduktion der Proliferation verursacht (s. Abbildung 27A). Unterstützt wurde dieser Befund auch durch einen im Vergleich zur Kontrolle oder zur alleinigen Erlotinib-Behandlung verminderten <sup>3</sup>[H]-Thymidineinbau der Zellen unter der Doppelbehandlung (s. Abbildung 27F).

### 3 Ergebnisse

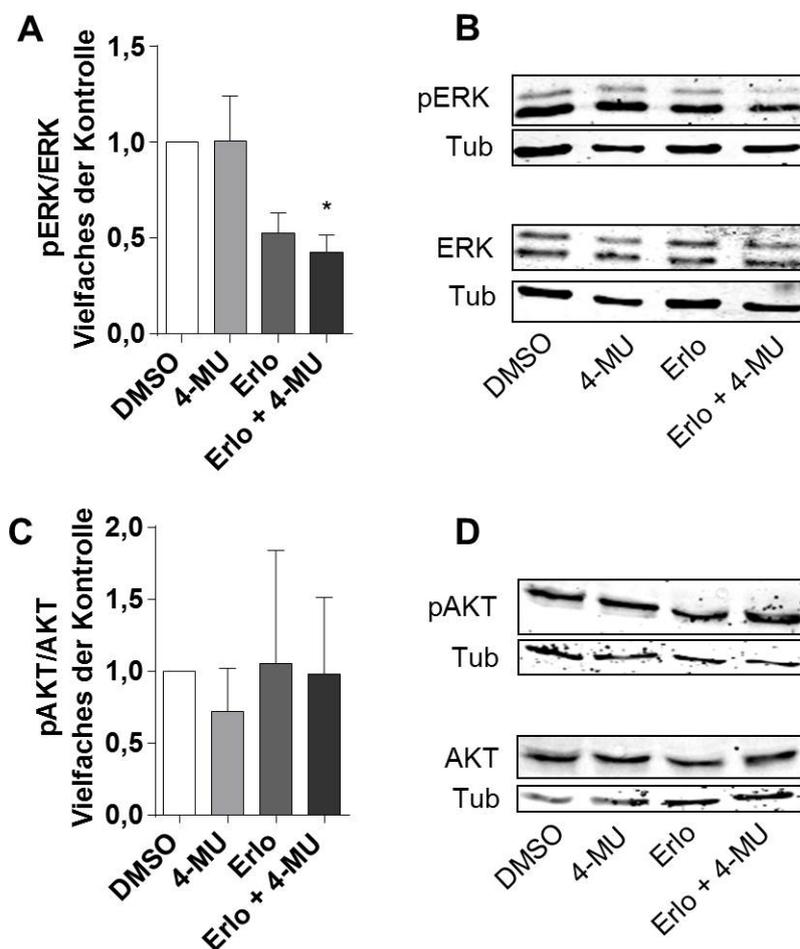


**Abbildung 27. Einfluss der Kombination von Erlotinib und 4-Methylumbelliferon auf die Proliferation.**

Zellzyklusanalyse nach 24-stündiger Behandlung mit Erlotinib und 4-MU allein, in Kombination oder mit DMSO. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in sub-G1- (A), G0/G1- (B), S- (C), G2/M-Phase (D), n = 5. E, Repräsentative Histogramme der Zellzyklusanalyse durch die ModFit LT™ Software. F, <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Einbau nach 24-stündiger Behandlung mit Erlotinib und 4-MU bzw. DMSO, n = 5. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. \*p < 0,05 gegenüber der Kontrolle, #p < 0,05 gegenüber Erlotinib + 4-MU.

### 3.3.4 Die Rolle möglicher involvierter Signalwege

Da sowohl der PI3K/AKT- als auch der MAPK/ERK-Signalweg nachgeschaltete Signalwege der EGFR und der HA-Rezeptoren sind, wurde ihre Aktivität unter Behandlung bestimmt. Dazu wurde das Verhältnis von aktivem, phosphorylierten Protein zur Gesamtmenge mittels Western-Blot-Analyse berechnet. Wie in Abbildung 28 dargestellt, führte die Kombination aus Erlotinib und 4-MU zu signifikant reduziertem phosphoryliertem ERK1/2 bezogen auf Gesamt-ERK, während kein Unterschied im Phosphorylierungsstatus von AKT unter Behandlung beobachtet wurde. Erlotinib und 4-MU allein zeigten keine signifikant reduzierte ERK-Phosphorylierung. Dennoch war ein Trend hin zu reduziertem Phospho-ERK durch Erlotinib zu erkennen (s. Abbildung 28A).

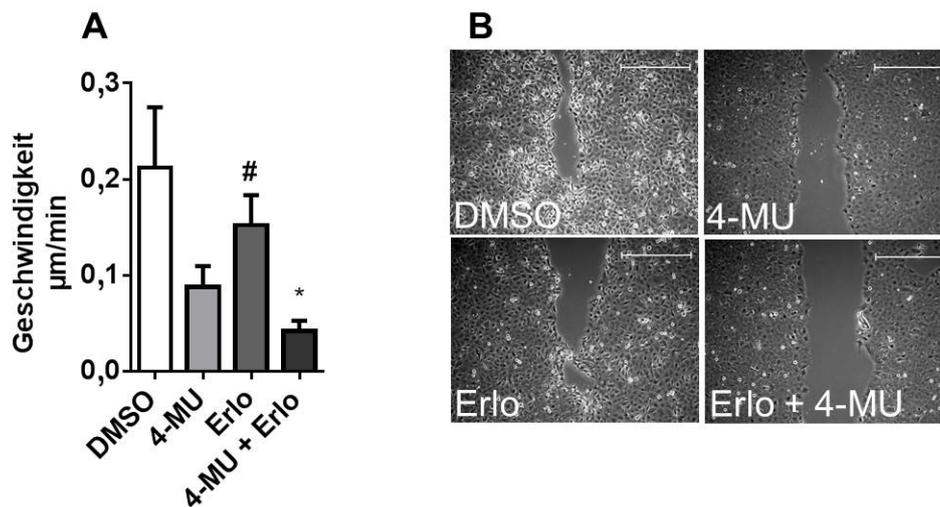


**Abbildung 28. ERK- und AKT-Phosphorylierung unter Behandlung mit Erlotinib und 4-Methylumbelliferon.**

**A**, Western-Blot-Analyse von phosphoryliertem ERK im Verhältnis zu Gesamt-ERK nach 24-stündiger Behandlung mit Erlotinib und 4-MU,  $n = 7$ . **B**, Repräsentativer Blot. **C**, Western-Blot-Analyse von phosphoryliertem AKT im Verhältnis zu Gesamt-AKT nach 24-stündiger Behandlung mit Erlotinib und 4-MU,  $n = 6$ . **D**, Repräsentativer Blot. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle, # $p < 0,05$  gegenüber Erlotinib + 4-MU.

### 3.3.5 Migration unter Behandlung mit Erlotinib und 4-Methylumbelliferon

Über EGFR- und HA-Signalwege können neben pro-proliferativen Effekten auch pro-migratorische Effekte vermittelt werden. Daher wurde durch Zeitraffer-Mikroskopie die Wundschluss-Geschwindigkeit zweier Zellfronten unter Erlotinib- und 4-MU-Behandlung untersucht. Gegenüber der Kontrolle zeigten die Zellen unter Doppelbehandlung eine signifikant reduzierte Migrationsgeschwindigkeit. Diese war auch im Vergleich zur alleinigen Erlotinib-Behandlung signifikant reduziert (Abbildung 29). Erlotinib und 4-MU allein konnten die Migrationsgeschwindigkeit nicht signifikant reduzieren. Allerdings deutete sich durch 4-MU-Behandlung ein nicht-signifikanter Trend zu reduzierter Geschwindigkeit an.



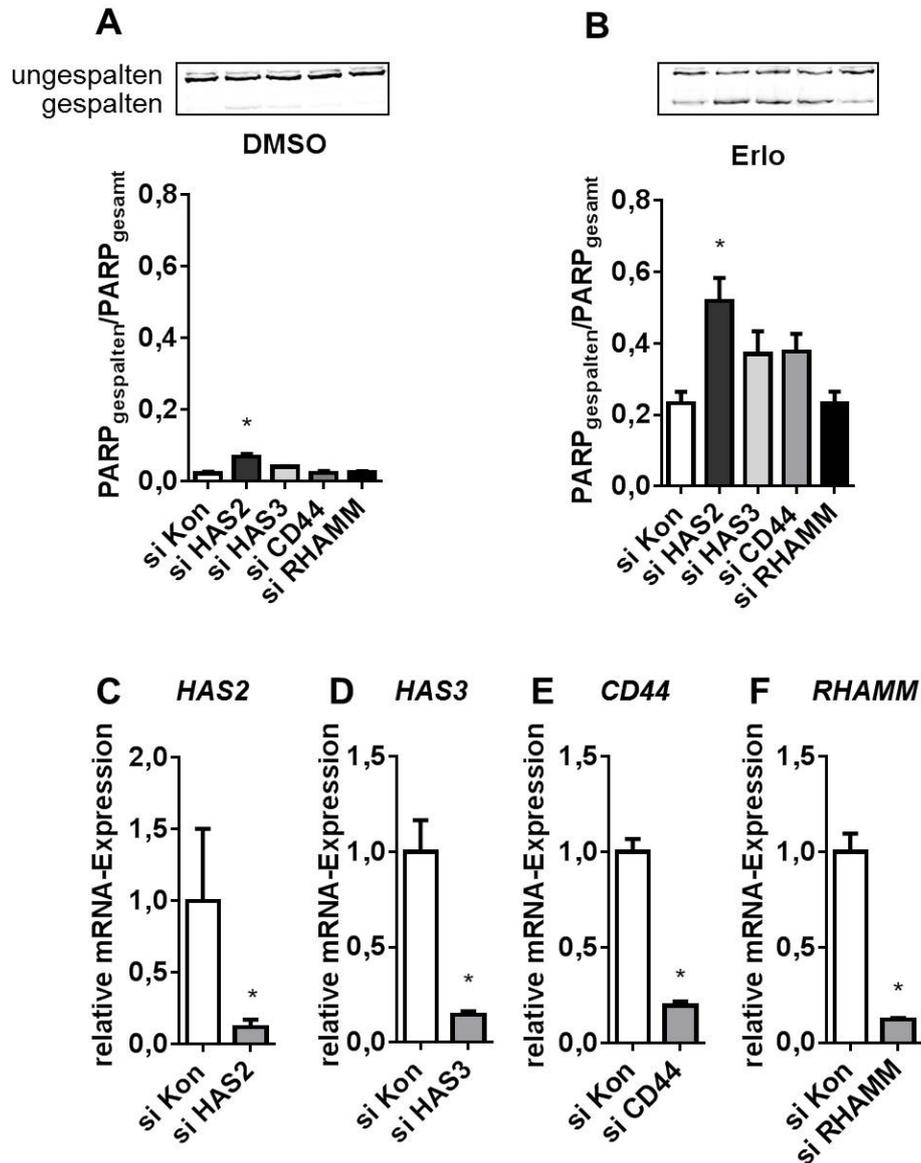
**Abbildung 29. Migration von KYSE-410-Zellen unter Behandlung mit Erlotinib und 4-Methylumbelliferon.**

**A**, Mittlere Geschwindigkeit der migrierenden Zellfronten innerhalb von 24 Stunden,  $n = 6$ . **B**, Repräsentative Aufnahmen der Zellen 12 Stunden nach Beginn des Experiments. Maßstabsbalken entspricht  $500 \mu\text{m}$ . Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle, # $p < 0,05$  gegenüber Erlotinib + 4-MU.

### 3.3.6 Einfluss des Hyaluronsäure-Systems auf die Apoptose unter Behandlung mit Erlotinib in einer hohen Konzentration

Da unter den vorangehend beschriebenen Bedingungen keine Apoptose zu beobachten war (s. Abbildung 27A), wurden die Zellen unter Serumentzug mit Erlotinib in einer höheren Endkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  behandelt. Daraufhin konnte als Zeichen apoptotischer Prozesse eine erhöhte PARP-Spaltung in der Western-Blot-Analyse beobachtet werden (s. Abbildung 30A, B, Vergleich der jeweils linken Säulen). Durch Transfektion mit si RNA gerichtet gegen *HAS2* lag signifikant mehr PARP gespalten vor (s. Abbildung 30A, B). Einen Trend zu mehr Apoptose unter Erlotinib-Behandlung zeigten auch mit si *HAS3* und si *CD44* transfizierte Zellen (s. Abbildung 30B). Transfektion mit si *RHAMM* hingegen erhöhte die PARP-Spaltung nicht. In Abbildung 30C-F ist zu sehen, dass die si RNA in der Lage war, die Expression der gewünschten Zielgene zu reduzieren.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 30. PARP-Spaltung nach *knockdown* von Hyaluronsäuresynthasen und Hyaluronsäurerezeptoren und Behandlung mit Erotinib in hoher Dosierung.**

**A**, Repräsentativer Blot und Quantifizierung von gespaltenem PARP bezogen auf die PARP-Gesamtmenge, DMSO-Behandlung, n = 4-5. **B**, Repräsentativer Blot und Quantifizierung von gespaltenem PARP bezogen auf die PARP-Gesamtmenge, Behandlung mit 10 µM Erlotinib, n = 4-5. **C-F**, Genexpression nach si RNA-Transfektion zur Kontrolle des *knockdown* von HAS und HA-Rezeptoren, n = 3. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM. \*p < 0,05 gegenüber der si RNA-Kontrolle.

#### 3.3.7 Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung in einem 3D-Zellkultur-Modell

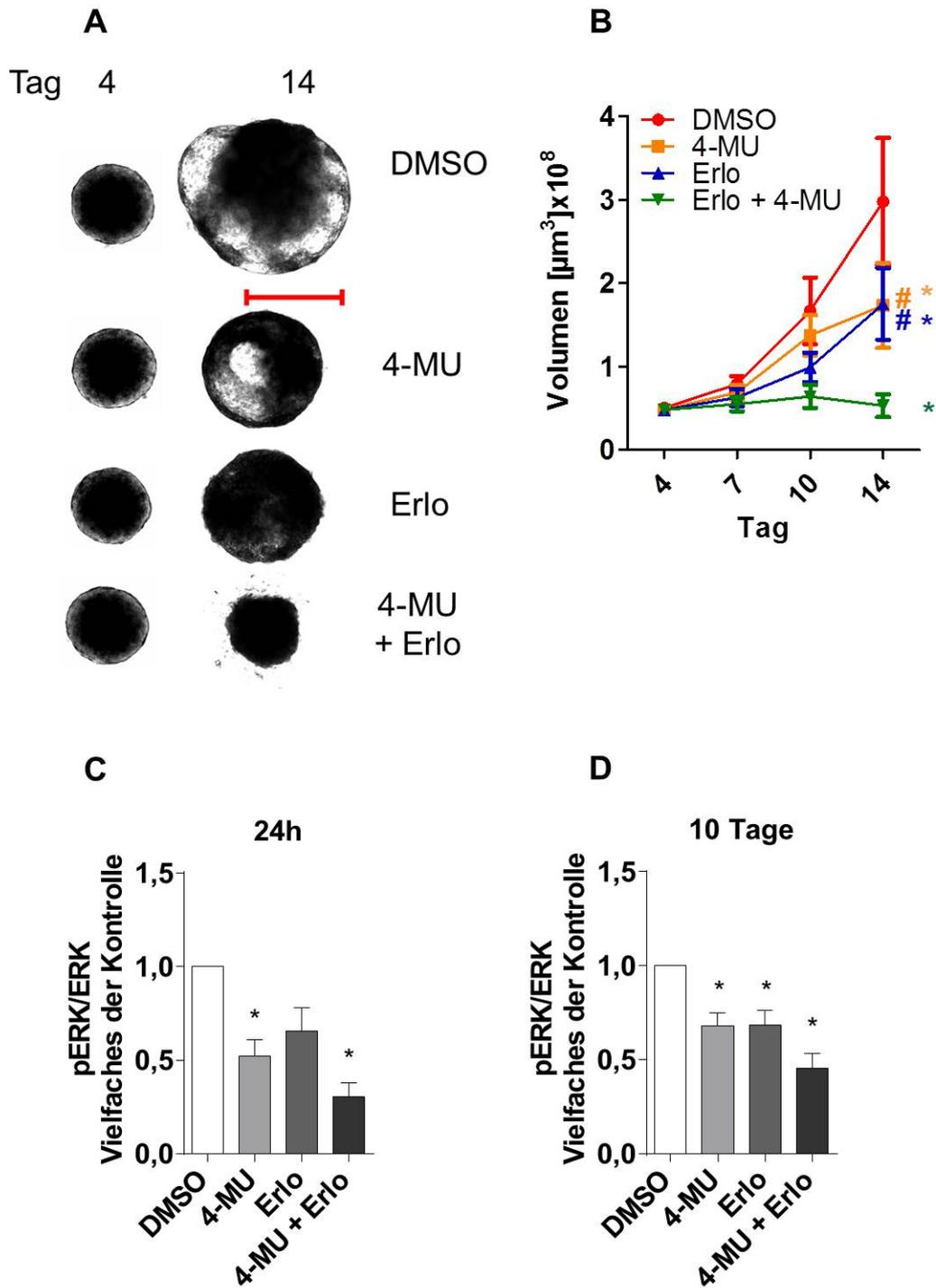
Zur weiteren Beurteilung der Wirksamkeit der Kombination aus Erlotinib und 4-MU wurde das komplexere 3D *in vitro*-Modell der MCTS gewählt. MCTS zeichnen sich durch metabolische und proliferative Gradienten aus und ermöglichen eine 3D-Matrixdisposition. Ebenso sind innere und äußere Schichten der MCTS anderen Arzneistoffkonzentrationen ausgesetzt. MCTS sollen daher die Physiologie von Mikrometastasen, Tumormikroregionen oder intervaskulären Domänen widerspiegeln [151, 178].

### 3 Ergebnisse

Auch in dem MCTS-System erwies sich die Kombination aus Erlotinib und 4-MU als wirksam. Das MCTS-Volumen nahm in der Gruppe der Doppelbehandlung nicht zu (s. Abbildung 31A, B). Das MCTS-Volumen unter Erlotinib und 4-MU-Behandlung war an Tag 14 nach Aussaat signifikant geringer als das der Kontrolle und als das von MCTS, die nur mit einer der beiden Substanzen behandelt wurden. Auch in dem 3D-Format wurde eine verminderte ERK-Phosphorylierung durch Doppelbehandlung beobachtet. Diese konnte sowohl nach 24-stündiger Behandlung, als auch nach 10-tägiger Behandlung nachgewiesen werden. Interessanterweise führte alleinige Behandlung mit 4-MU in der 3D-Zellkultur zu signifikant reduzierter ERK-Phosphorylierung (s. Abbildung 31C). Ein Befund, der nicht in dem Ausmaß in der 2D-Kultur beobachtet werden konnte (s. Abbildung 28A).

Zusammenfassend erwies sich die Hemmung der HA-Synthese durch 4-MU und die der EGFR-Tyrosinkinase durch Erlotinib als wirksame Kombination, um die Proliferation von KYSE-410-Zellen *in vitro* zu reduzieren. Die Interaktion von 4-MU und Erlotinib wurde als synergistisch bewertet und führte zu verminderter ERK-Phosphorylierung und reduzierter Zell-Migration. Außerdem war das Wachstum von MCTS durch die Kombination gehemmt. Höhere Erlotinib-Konzentrationen vermochten es, die Apoptose der Zellen zu induzieren, die durch den *knockdown* von HAS2 verstärkt wurde.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 31. Erlotinib und 4-Methylumbelliferon in der 3D-Zellkultur.**

**A**, Repräsentative Abbildungen von MCTS vor (Tag 4) und 10 Tage nach (Tag 14) Beginn der Behandlung mit Erlotinib und 4-MU bzw. DMSO. Maßstabsbalken entspricht 500  $\mu\text{m}$ . **B**, MCTS Volumina vor (Tag 4) und nach 3, 6 und 10 Tagen Behandlung mit Erlotinib und 4-MU bzw. DMSO,  $n = 6$ . **C**, **D** Phospho-ERK im Verhältnis zu Gesamt-ERK nach 24-stündiger (**C**) bzw. 10-tägiger (**D**) Behandlung der MCTS quantifiziert mit Hilfe der Western-Blot-Analyse,  $n = 7$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle, # $p < 0,05$  gegenüber Erlotinib + 4-MU.

### 4 Diskussion

HA kann auf vielfältige Weise das Tumorgeschehen modulieren. Zum Beispiel spielt sie eine Rolle bei der Proliferation, Migration und dem Überleben mancher Tumorzellen und beeinflusst Zell-Phänotypen und die Immunantwort. Damit ist HA ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt, beispielsweise zur Therapie des Ösophaguskarzinoms. Unterschiedliche Aspekte zur HA im Kontext des Ösophaguskarzinoms wurden in den drei Teilen der vorliegenden Arbeit beleuchtet.

Im ersten Teil wurden Untersuchungen zur Funktion einer verkürzten Splicevariante der HAS3 durchgeführt, HAS3b, die in Gewebeproben von Adenokarzinomen des Ösophagus gefunden worden war. HAS3b produzierte keine extrazelluläre HA und bildete Oligomere mit HAS-Isoformen, beeinflusste aber dennoch nicht die HA-Produktion von HAS2 und HAS3a.

Die Interaktion von Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus und Fibroblasten führte durch die Induktion der *Has2*-mRNA-Expression zu einem HA-reichen Milieu. Dieses Ergebnis war der Ausgangspunkt zu den Untersuchungen, die im zweiten Teil der Arbeit dargelegt sind. Da kein Einfluss der *Has2*-Induktion auf die Zellproliferation oder Migration gefunden wurde, spielt *Has2* eventuell eine Rolle bei der Modulation der Immunantwort, neben ihrer Beeinflussung des Myofibroblasten-Phänotyps. Interessanterweise veränderten die Tumorzellen auch das Chemokinprofil der Fibroblasten.

Tatsächlich führte die Hemmung der HA-Synthese durch 4-MU in Kombination mit dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib zu verminderter Proliferation von Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus *in vitro*. Weitere Ergebnisse zur Wirkung dieser Kombination sind im dritten Teil dieser Arbeit erörtert.

#### 4.1 Eigenschaften der Hyaluronsäuresynthase 3-Isoform b

HAS3b ist das Proteinprodukt von *HAS3v2*, einer kurzen Splicevariante der *HAS3*. *HAS3v2* wurde in humanen EAC-Proben gefunden [3]. Da für aberrante Splicevarianten der HAS1 bekannt ist, dass sie untereinander und mit der langen HAS1-Isoform Oligomere bilden können [70], wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob HAS3b ebenso vermag, Oligomere zu bilden und, ob diese Oligomerisierung Einfluss auf die HA-Synthese hat.

Hinweise auf eine Oligomerbildung gab die Quervernetzung der HAS3b mit Glutaraldehyd und anschließende Western-Blot-Analyse. Nach Quervernetzung waren neben deutlichen Banden der HAS3b auf der Höhe der Monomere auch Banden auf der Höhe möglicher Di-,

## 4 Diskussion

Tri- oder Tetramere zu sehen. Die mit reduzierenden Agenzien wie Dithiothreitol (DTT) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol erhitzten Proben zeigten vor allem eine klare Bande auf der Höhe von Monomeren. Schwach war dennoch auch eine Bande bei etwa 70 kDa sichtbar (s. Abbildung 9). Dies könnte entweder auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen sein oder es handelte sich um eine Oligomerisierung, die nicht durch reduzierende Agenzien spaltbar war. Letzteres entspräche der von Karousou *et al.* beschriebenen Beobachtung für HAS2-Dimere [76]. In zukünftigen Experimenten könnte durch Verwendung von bifunktionalen N-Hydroxysuccinimid-Estern, wie zum Beispiel Disuccinimidylsuberat, die Oligomerbildung von HAS3b bestätigt werden. Vorteil wäre die definierte Länge der Kohlenwasserstoffkette zwischen den beiden funktionellen Gruppen, über die die Proteine quervernetzt würden.

Auch die FRET-Experimente legen nahe, dass HAS3b Oligomere bildete. Sowohl Homo- als auch Heterooligomerisierung waren möglich. In Zellen, die mCherry-HAS3b und gleichzeitig EGFP-gekoppelte HAS-Isoformen exprimierten, wurde eine Zunahme der EGFP-Fluoreszenz nach dem Bleichen von mCherry gegenüber der EGFP-Kontrolle detektiert. Der Abstand zwischen diesen Proteinen war also so gering, dass ein Teil der Energie von EGFP auf mCherry transferiert werden konnte. Durch die Co-IP-Experimente konnte die Bildung von HAS3b-Homooligomeren bestätigt werden. Oligomer-Bildung ist auch für aberrante HAS1-Splicevarianten, die Homo- und Heterooligomere mit der langen HAS1-Variante bilden, und für murine HAS2, als Homooligomer und Heterooligomer mit HAS3, bekannt [70, 76].

Die größte FRET-Effizienz wurde für das Paar HAS1/HAS3b berechnet. Gemeinsam ist beiden, dass sie nach Transfektion in COS-1-Zellen keine extrazelluläre HA produzieren. HAS1 benötigt dazu Zusätze wie Glucosamin [88]. Im Gegensatz zur HAS1 konnte bei HAS3b-bildenden COS-1-Zellen keine Produktion eines perizellulären HA-Mantels durch Glucosamin-Stimulation gezeigt werden. HAS3b ist intrazellulär in der ER- und Golgi-Region lokalisiert [3]. Da auch HAS1,-2 und -3a intrazellulär in Golgi bzw. ER zu finden sind [84], werden dies vermutlich die Orte der Oligomerbildung sein. Getestet wurde jeweils nur die Interaktion von HAS-Isoformen mit N-terminalen Fluoreszenzproteinen. Da unbekannt ist, wie die Proteine im Oligomer ausgerichtet sind, könnte es sein, dass eine Fusion der Fluoreszenzproteine an anderer Stelle der HAS-Isoformen sogar einen besseren Energietransfer ermöglichen würde.

Die Funktion der Heterooligomerisierung der HAS3b bleibt unklar, denn die von HAS2 und HAS3a gebildete extra- und perizelluläre HA war durch Co-Expression von HAS3b nicht

## 4 Diskussion

verändert. Eventuell könnte der Einfluss von HAS3b erst bei einer Doppeltransfektion mit Plasmiden, die für HAS1 codieren, deutlich genug werden, um sie detektieren zu können. Die hier beschriebenen Untersuchungen beschränkten sich auf die Interaktion mit HAS2 und HAS3a, da diese im Gegensatz zu HAS1 bereits extrazelluläre HA in COS-1-Zellen bilden und keiner externen Stimuli bedürfen.

Auch die Lokalisation von HAS2 und HAS3a erschien durch HAS3b nicht verändert. Es wurde beschrieben, dass aberrante HAS1-Splicevarianten zu einer veränderten zellulären Lokalisation der langen HAS1- und HAS3-Variante führten und die Halbwertszeit der langen HAS1-Variante verlängerten [70]. In weiterführenden Experimenten könnte untersucht werden, ob auch HAS3b Einfluss auf die Stabilität von HAS-Isoformen hätte. Dazu würden HAS-exprimierende Zellen mit HAS3b-Konstrukten oder Kontrollplasmiden transfiziert werden und anschließend mit einem Translationshemmer behandelt werden. Dies würde eine Analyse der Halbwertszeit der HAS-Isoformen in An- oder Abwesenheit von HAS3b mittels Western-Blot-Analyse ermöglichen.

Da in den doppelt-transfizierten Zellen nur die extrazelluläre HA-Konzentration bestimmt wurde, besteht außerdem die Möglichkeit, dass die Menge der intrazellulären HA in COS-1-Zellen zunimmt, wenn HAS3b zusammen mit einer langen, funktionstüchtigen HAS-Isoform exprimiert wird. HAS3b könnte dann die gebildete HA intrazellulär binden oder auch selbst an der Synthese intrazellulärer HA beteiligt sein [3, 70]. Darüber hinaus könnte die Funktion der HAS3b unabhängig von HA sein.

Im Hinblick auf weiterführende Experimente ist auch ein möglicher Nachweis von HAS3b-Oligomeren nicht nur in artifiziellen, HAS3b-überexprimierenden *in vitro*-Modellen, sondern auch in Gewebeproben des EAC zu erwägen. Dies könnte zum Beispiel mit Hilfe eines *Proximity Ligation Assays* erfolgen [179].

### 4.2 Interaktion von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten

Die Rolle der Hyaluronsäure in der Interaktion von Fibroblasten mit KYSE-410-Zellen war Gegenstand des zweiten Teils dieser Arbeit.

#### 4.2.1 Hyaluronsäuresynthese 2-Induktion in Fibroblasten in direkter Ko-Kultur

Experimente zum Verständnis von CAF wurden an normalen Hautfibroblasten (SF) und an primären CAF durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein direkter Kontakt von KYSE-410-Zellen mit SF und mit CAF zu einer Induktion der *Has2* führte. Die Verwendung von SF stellte ein Modell lokaler Gewebsfibroblasten dar, die initial Kontakt mit Tumorzellen bekommen. Eventuell spiegelt der *in vitro*-Befund einer *Has2*-Induktion tatsächlich Prozesse wider, die bei invadierenden Ösophaguskarzinomzellen ablaufen. Es wurde gezeigt, dass Ösophaguskarzinomzellen, die den Muskel invadieren mit stark HA-positiven Stromalen Zellen umgeben sind [66]. In CAF des oralen Plattenepithelkarzinoms konnte im Vergleich zu normalen Fibroblasten mehr HA in einer *in vitro*-3D-Kultur gefunden werden [180].

##### 4.2.1.1 An der Hyaluronsäuresynthese 2-Induktion beteiligte Signalwege

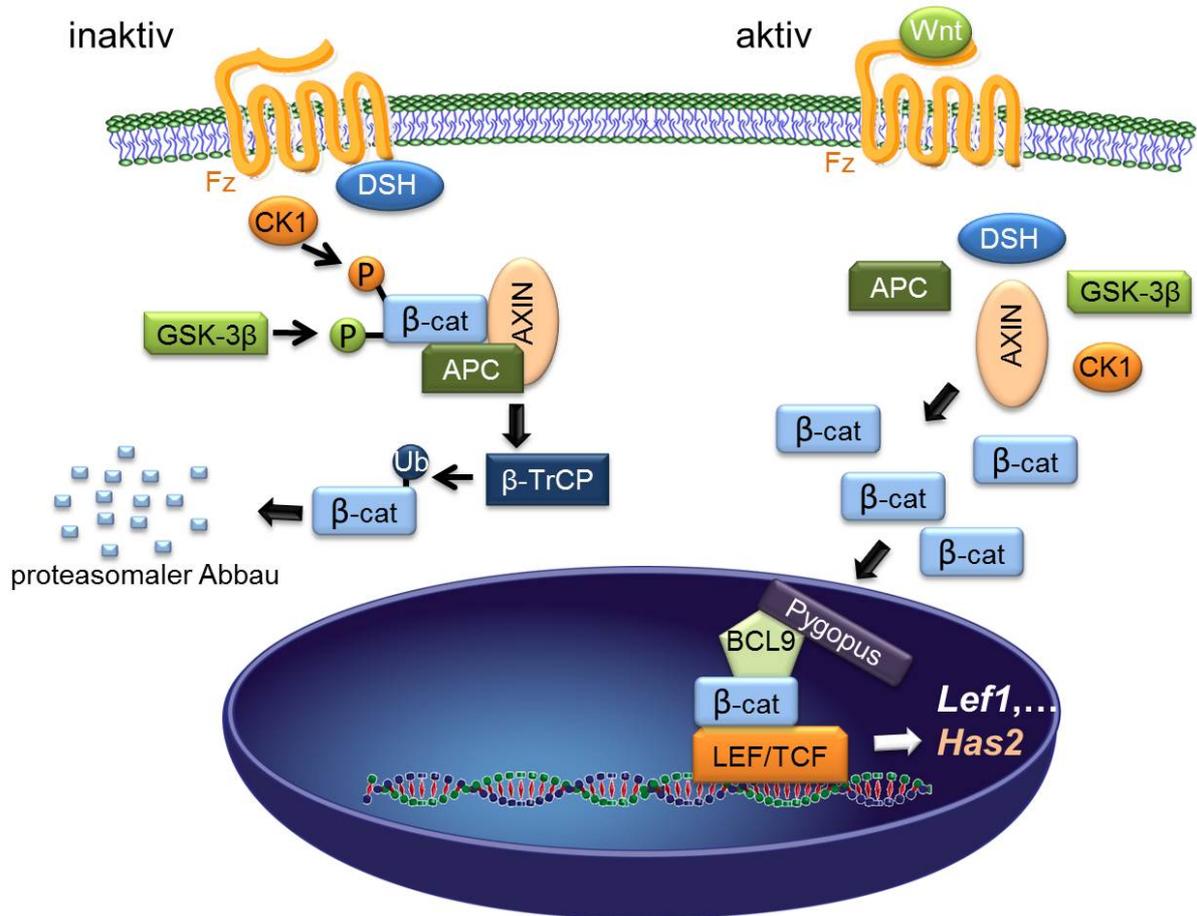
Die *HAS2*-Expression in Fibroblasten wird unter anderem über den ERK-Signalweg stimuliert und entsprechende Inhibitoren können die *HAS2*-mRNA-Expression senken [170-172]. Auch hier, in den Monokulturen muriner Fibroblasten, wurde die *Has2*-mRNA-Expression durch den MEK1-Inhibitor PD98059 reduziert. Nichtsdestotrotz konnte aber durch die Ko-Kultur *Has2* induziert werden, sodass vermutlich ein MEK-1-unabhängiger Mechanismus für diese Induktion verantwortlich war. Auch Melanomzellen vermögen es, *HAS2* in normalen dermalen Fibroblasten zu induzieren [172, 181]. Dieser Effekt wurde allein durch das konditionierte Medium via PDGFR-PI3K-AKT und p38-Aktivierung vermittelt [172, 181]. Stern *et al.* postulierten, dass Stromale Fibroblasten stimuliert durch Lactat aus der anaeroben Glycolyse der Tumorzellen verstärkt HA produzieren [182]. Die Stimulation der HA-Synthese durch Lactat in humanen Fibroblasten konnte allerdings in anderen Publikationen nicht gezeigt werden [172, 183].

Außerdem wurde überprüft, ob Basigin an der *Has2*-Induktion beteiligt war. In Brustkrebszelllinien führt eine Überexpression von Basigin zur Induktion der *HAS*-mRNA und der HA-Synthese [173]. Und in Ko-Kultur von SKBR3 und MCF7 Brustkrebszelllinien mit Fibroblasten aus der Brust wurde Tumorzell-assoziiertes-Basigin durch *knockdown*-

## 4 Diskussion

Versuche als Faktor für die Fibroblastenaktivierung und induzierte  $\alpha$ SMA-Expression identifiziert [184]. Es ist bekannt, dass Medium, das von Keratinozyten konditioniert wurde, die HA-Synthese in Fibroblasten induziert. Diese Induktion kann durch Entfernen von Basigin aus dem konditionierten Medium wieder reduziert werden [185]. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente war durch *knockdown* von Basigin in KYSE-410-Zellen die *Has2*-mRNA-Expression in Fibroblasten nicht mehr signifikant induziert. Im direkten Vergleich der Ko-Kulturen gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied in der *Has2*-mRNA-Expression, wenn die *de novo* Synthese von Basigin der KYSE-410-Zellen durch siRNA reduziert war. *Knockdown* von Basigin in den Fibroblasten selbst hatte keinen Einfluss auf die *Has2*-mRNA-Expression.

In der vorliegenden Arbeit wurde das DNA-Bindeprotein LEF1 zum ersten Mal als beteiligtes Protein an der Tumorzell-vermittelten *Has2*-Induktion in Fibroblasten identifiziert. LEF1 fungiert durch Bindung von  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsfaktor [186].  $\beta$ -Catenin befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite von Zell-Zell-Kontakten, wo es Cadherine über  $\alpha$ -Catenin mit dem Zytoskelett verbindet. Freies cytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin kann in den Zellkern transportiert werden, wird aber normalerweise rasch abgebaut. Kanonische Wnt-Signaltransduktion verhindert den Abbau von  $\beta$ -Catenin, sodass dieses in den Nukleus gelangt und Transkriptionsfaktorkomplexe mit Mitgliedern der TCF/LEF-Familie bildet (s. Abbildung 32). Nukleäres  $\beta$ -Catenin ist also zentraler Effektor des kanonischen Wnt-Signalwegs. Als positive *feedback*-Schleife induziert der Wnt-Signalweg unter anderem die LEF1-Expression [169]. LEF1 wiederum kann  $\beta$ -Catenin im Nukleus stabilisieren [187]. Neben dem Vorkommen von nuklearem  $\beta$ -Catenin in den Fibroblasten deutet die induzierte *Lef1*-Transkription auf eine durch die Ko-Kultur in den Fibroblasten erhöhte kanonische Wnt-Signaltransduktion hin. *Knockdown* von *Lef1* in den Fibroblasten verhinderte die Induktion von *Has2*-mRNA in der Ko-Kultur.



**Abbildung 32. Kanonische Wnt-Signaltransduktion.**

Schematische Darstellung nach [169]. Ist Wnt-Signaltransduktion inaktiv, wird  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -cat) in einem Komplex aus Axin, *adenomatous polyposis coli* (APC), Casein Kinase 1 (CK1), Glykogen Synthase Kinase 3- $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) phosphoryliert (P) und anschließend unter Beteiligung des  $\beta$ -transducin repeat-containing protein ( $\beta$ -TrCP) für den proteasomalen Abbau ubiquitinyliert. Aktivierung des *Frizzled* Rezeptors (Fz) durch Bindung des Wnt-Liganden führt zu einer *Dishevelled* (DSH)-vermittelten Hemmung des  $\beta$ -cat-abbauenden Komplexes, sodass  $\beta$ -cat in den Kern gelangen kann. Nach Interaktion mit Proteinen aus der TCF/LEF-Familie und Ko-Aktivatoren (*B-cell lymphoma 9*, BCL9 und *Pygopus*) wird die Genexpression angeregt.

Dass *Has2* Zielgen von Wnt-Signaltransduktion bzw. von  $\beta$ -Catenin ist, konnte durch die Transfektion von Prostatakarzinomzellen mit einer sehr aktiven  $\beta$ -Catenin-Mutante gezeigt werden, die zu einer Induktion von *HAS2*-mRNA führte [188]. An *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Zellen konnte man nach  $\beta$ -Catenin Überexpression eine Induktion des perizellulären HA-Mantels feststellen [41]. Und Wnt3a induzierte *HAS2*- und *HAS3*-Genexpression in embryonalen Fibroblasten [189].

Offen bleibt hier die Frage, ob die Wnt-Signaltransduktion direkt durch extrazelluläre Wnt-Proteine von KYSE-410-Zellen induziert wurde und/oder sekundär die Fibroblasten zu verstärkter Wnt-Autostimulation angeregt wurden. Möglicherweise ist die letztere Option der Fall, denn CAF, die aus ESCC isoliert werden, weisen eine erhöhte Expression von Wnt2,

Wnt5a und LEF1 im Vergleich zu normalen Fibroblasten auf [177]. Interessanterweise ist Wnt2 in ESCC mit einem verkürzten krankheitsspezifischen Überleben assoziiert [190].

### **4.2.1.2 Einfluss des direkten Zell-Zell-Kontakts auf die Induktion der Hyaluronsäuresynthese 2**

Unter den hier vorgestellten Versuchsbedingungen war die *Has2*-Induktion nur bei direktem Kontakt von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten nachweisbar. Grundsätzlich können über direkten Kontakt zum Beispiel juxtakrin Signale übertragen werden oder über *Gap-Junctions*. Es wird diskutiert, dass parakrine Signale auch über den direkten Kontakt durch spezialisierte Filopodien (*Cytonemes*) vermittelt werden [191, 192]. In mikroskopischen Zeitraffer-Aufnahmen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Filopodien zwischen KYSE-410-Zellen und Fibroblasten erkannt werden (s. Abbildung 15A).

Wnt-Proteine werden posttranslational durch Lipide modifiziert und sind hydrophob. Es gibt verschiedene Theorien, wie sie trotz ihres hydrophoben Charakters zur Zielzelle gelangen können. Neben der Solubilisierung durch Micell-Bildung, Bindung an Lipid-bindende Proteine oder durch Exosomen, könnten sie über Matrixmoleküle an der Zelloberfläche gebunden werden und dann von der Zelloberfläche der einen Zelle auf die Zelloberfläche der Zielzelle bei Kontakt übertragen werden. Ein anderer möglicher Mechanismus wäre die Ausbildung von Rezeptor- bzw. Ligand-tragenden *Cytonemes*, die die beiden Zellarten verbinden [191, 193]. Die beiden letzteren Möglichkeiten würden erklären, warum das gegebenenfalls an der *Has2*-Induktion beteiligte extrazelluläre Wnt-Signal dennoch nur durch direkten Zell-Zell-Kontakt übertragen werden konnte.

### **4.2.1.3 Mögliche Rolle von $\beta$ -Catenin an Zell-Zell-Kontakten von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten**

Als Nebenbefund ergab die Immunzytochemie neben dem Nachweis von nuklearem  $\beta$ -Catenin auch positive  $\beta$ -Catenin-Signale an manchen heterotypischen Zell-Zell-Kontakten zwischen den murinen Hautfibroblasten und den humanen KYSE-410-Zellen. Das wäre ein Hinweis darauf, dass an diesen Stellen möglicherweise ein Zell-Zell-Kontakt über Cadherin-Interaktion besteht. In MCF7 Brustkrebszellen wurde Cadherin-23 an heterotypischen Kontakten zu Fibroblasten in Kultur beschrieben [194]. Weiterhin zeigen Nachweise von N-Cadherin an Kontakten von Melanomzellen mit Fibroblasten [195], an Prostata-Adenokarzinomzellen mit stromalen Fibroblasten [196] sowie an Kontakten von epithelialen Zellen mit Fibroblasten aus der Ratte [197] eine Ausbildung von Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakten.

### 4.2.2 Veränderung der Zell-Phänotypen durch die Ko-Kultur

#### 4.2.2.1 Untersuchungen zur epithelial-mesenchymalen Transition von KYSE-410-Zellen in Ko-Kultur

Als mögliche Folge der *Has2*-Induktion wurden Veränderungen im Phänotyp der KYSE-410-Zellen durch die direkte Ko-Kultur untersucht. Sowohl für HA als auch für die Ko-Kulturbedingung sind EMT-induzierende Eigenschaften beschrieben. Durch den Prozess der EMT verlieren die Zellen ihre epithelialen Eigenschaften – ein Hauptmerkmal ist der Verlust von E-Cadherin. Gleichzeitig gewinnen die Zellen mesenchymale Eigenschaften. Sie bauen das Aktinzytoskelett um und bekommen eine eher langgestreckte Morphologie. Außerdem werden mesenchymale Marker wie Vimentin, Fibronectin und N-Cadherin gebildet. Auch SNAI1, SNAI2 und ZEB1 sind EMT-Marker. Diese induzieren EMT-Prozesse durch die Modulation der Transkription. Typischerweise können Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1, aber auch EGF, HGF und PDGF EMT induzieren [47]. Diese Wachstumsfaktoren werden zum Beispiel von CAF sezerniert [5, 8, 198]. Auch über Wnt/ $\beta$ -Catenin kann EMT induziert werden [199]. Wachstumsfaktoren induzieren oft transiente EMT nach wenigen Stunden bis einigen Tagen. Stabile EMT hingegen wird durch die Expression ausgewählter transkriptioneller EMT-Induktoren oder deren Regulatoren hervorgerufen [47].

In der Literatur gibt es Hinweise, dass Fibroblasten EMT von Tumorzellen stimulieren können. Verschiedene Tumorzellen und Fibroblasten, sowie unterschiedliche Kulturbedingungen liegen den Experimenten zugrunde. Durch die Ko-Kultur mit normalen Fibroblasten und CAF zeigen MCF7 Brustkrebszellen nach einer Woche eine Herunterregulation von E-Cadherin und eine Induktion von N-Cadherin und Vimentin [200]. CAF-konditioniertes Medium konnte innerhalb von 6 bzw. 10 Tagen EMT-Marker in MCF7 verändern – stärker als konditioniertes Medium von normalen Fibroblasten [175]. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass EMT-Marker in Brustkrebszelllinien bereits nach 2 Tagen Behandlung mit CAF-konditioniertem Medium eine entsprechende Regulation aufwiesen [198]. Auch in Prostatakarzinomzellen führte bereits eine 48-stündige Inkubation mit Überständen aktivierter Fibroblasten zur Proteinexpression von EMT-Markern Vimentin, SNAI1 und TWIST und zu reduziertem E-Cadherin [201] und direkter Kontakt mit CAF führte nach 7 Tagen zu EMT von NSCLC-Zellen [176]. In kolorektalen Adenokarzinomzellen konnte *SNAI1*-, *SNAI2*-, *ZEB1*-mRNA durch konditioniertes Medium normaler Fibroblasten und durch CAF-konditioniertes Medium induziert und E-Cadherin-Proteinexpression reduziert werden [202].

## 4 Diskussion

Um zu untersuchen, ob auch KYSE-410-Zellen in Ko-Kultur mit normalen Hautfibroblasten oder mit CAF EMT-Marker verstärkt exprimieren, wurden unterschiedliche Kulturbedingungen gewählt. Die EMT-Marker wurden nach 48 und 96 Stunden in Ko-Kultur mit Hautfibroblasten und nach 96-stündiger Ko-Kultur mit CAF quantifiziert. Um ein Überwachsen der Fibroblasten mit KYSE-410-Zellen zu vermeiden, wurde die Ko-Kultur nicht länger als 96 Stunden geführt. Unter diesen Bedingungen war keine signifikante Veränderung der gewählten Marker zu beobachten.

Auch die HA-Synthese kann einen Effekt auf die EMT ausüben. MDCK-Zellen und humane normale Mammaepithelzellen weisen bereits 2 Tage nach adenoviral-induzierter HAS2-Überexpression mesenchymale Merkmale auf. Zusätzlich sind sie in ihrer Invasivität gesteigert [41]. TGF- $\beta$  kann EMT in NMuMG Mammaepithelzellen nach etwa 8 Stunden induzieren und ein gleichzeitiger *knockdown* der HAS2 schwächt die Expression der EMT-Marker ab. Interessanterweise kann trotz *knockdown* von CD44 durch si RNA oder Verdau extrazellulärer HA mit Hyaluronidase kein Effekt auf die TGF- $\beta$ -induzierte EMT festgestellt werden. Weiterhin hat auch die Expression der dominant-negativen Form der HAS2 keine hemmende Wirkung [44]. Allein die HAS2-Expression in diesen epithelialen Zellen ist also für die EMT-Induktion mitverantwortlich, nicht aber ihr Produkt, HA. Analog dazu hatte auch in den hier vorliegenden Experimenten die durch Fibroblasten produzierte HA keinen Einfluss auf die Expression von *FN1*, *VIM*, *SNAI1* und *CDH1* in KYSE-410-Zellen. Weiterhin spielte auch die endogene HA-Synthese keine erkennbare Rolle für die EMT, denn unter 4-MU-Behandlung konnte keine signifikante Veränderung der EMT-Marker festgestellt werden. Lediglich ein nicht-signifikanter Trend zu mehr E-Cadherin-mRNA durch 4-MU-Behandlung wurde gemessen.

Die Tatsache, dass in KYSE-410-Zellen im Rahmen dieser Arbeit keine Veränderung der EMT-Marker beobachtet werden konnte, könnte zum einen in den gewählten Versuchsbedingungen begründet sein. Etwa könnte die Zeit der Ko-Kultur für die Induktion der Phänotypveränderung nicht ausgereicht haben. Zum anderen ist auch möglich, dass KYSE-410-Zellen grundsätzlich keine EMT-Prozesse durchlaufen. Im Allgemeinen konnte in ESCC jedoch das Phänomen der EMT beobachtet werden. In Gewebeschnitten von ESCC wurde EMT anhand der Marker E-Cadherin und Vimentin untersucht [203-205]. Zum Beispiel wurde in nur 19 % der Proben vermindertes E-Cadherin und in 20 % der Proben Vimentin in der invasiven Front detektiert [205]. In KYSE-30-Zellen führte Wnt2-konditioniertes Medium zur Verminderung von E-Cadherin und in EC109-Zellen zu mehr Vimentin, welches eine für EMT typische erhöhte Migration und Invasion der Zellen zur Folge hatte [190]. CAF aus ESCC zeigen erhöhte Wnt-Signaltransduktion und könnten so EMT induzieren [177]. Auch in den

## 4 Diskussion

hier dargelegten Experimenten könnte in der Ko-Kultur aktivierte Wnt-Signaltransduktion vorliegen, denn die *Has2*-Induktion war vom Transkriptionsfaktor LEF1 abhängig. Dennoch konnte keine signifikante Veränderung der gewählten EMT-Marker festgestellt werden.

### 4.2.2.2 Untersuchungen zur Proliferation von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten in Ko-Kultur

Auch im Hinblick auf proliferative Eigenschaften von Zellen sind sowohl für HA als auch für Ko-Kulturbedingungen modulierende Eigenschaften beschrieben. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Proliferation von KYSE-410-Zellen durch die Ko-Kultur mit Fibroblasten verändert war. Außerdem wurde die Proliferation von Fibroblasten in Ko-Kultur mit und ohne *knockdown* von *Has2* gemessen, um den möglichen Einfluss der *Has2* zu untersuchen.

In den hier beschriebenen Experimenten konnte kein Anstieg der KYSE-410-Zellzahl durch die Ko-Kultur beobachtet werden. Das könnte verschiedene Ursachen haben. Die beschriebenen pro-proliferativen Eigenschaften von HA basieren vor allem auf Ergebnissen von Untersuchungen nach Überexpression oder *knockdown* von HAS-Isoformen. In verschiedenen Tumorzellen, darunter ESCC, führte der HAS-*knockdown* zu verminderter Proliferation [32-34] und Überexpression zu gesteigerter Proliferation [35]. Unter Umständen ist für pro-proliferative Signale auf KYSE-410-Zellen nur die von KYSE-410-Zellen endogen produzierte HA nötig. Exogen zugeführte HA, zum Beispiel durch konditioniertes Medium von Hautfibroblasten, konnte im Vergleich zu konditioniertem Medium von HAS2-*knockdown* Fibroblasten die Proliferation von Melanomzellen nur leicht erhöhen [172]. Auch in J82 urothelialen Blasenkarzinomzellen führte exogene HA in Form von Healon® nur zu einem geringen Anstieg der Zellzahl [206]. Die Bedeutung der endogenen HA-Produktion für die Proliferation von KYSE-410-Zellen wird im dritten Teil der vorliegenden Arbeit deutlich. 4-MU allein konnte die Zahl der KYSE-410-Zellen reduzieren. Außerdem ist anzumerken, dass eine Proliferationshemmung durch Entfernen eines Stimulus nicht bedeuten muss, dass eine Erhöhung dieses Stimulus zu einer gesteigerten Proliferation führt. Hinzu kommt, dass es Hinweise aus der Literatur gibt, dass die pro-proliferative Wirkung von HA konzentrationsabhängig sein kann und eine sehr hohe endogene HA-Produktion hervorgerufen durch alleinige HAS-Überexpression mit einer erniedrigten Proliferation assoziiert ist [19, 29-31]. Möglich wäre also auch, dass in den hier präsentierten Experimenten zu viel HA gebildet wurde. Außerdem könnte das Molekulargewicht der von der Fibroblasten-HAS2 synthetisierten HA-Spezies nicht für die Induktion pro-proliferativer Signalwege geeignet sein. Humane Blasenkrebszellen etwa, die mit hochmolekularer HA behandelt wurden, waren in der Folge in ihrer Zahl gegenüber der Kontrolle reduziert [207].

## 4 Diskussion

Da Tumore aus mehr Zelltypen als nur Fibroblasten und Karzinomzellen bestehen, wäre möglich, dass die erhöhte HAS2-Expression in Fibroblasten pro-proliferative Stimuli indirekt induzieren kann. Durch HAS2-Expression in Tumorstammzellen werden TAM stimuliert, PDGF-BB zu produzieren. Dieses wiederum stimuliert stromale Zellen wie MSC und Knochenmarksfibroblasten, Wachstumsfaktoren zu exprimieren, die zu einer verstärkten Tumorstammzellproliferation führen. Die konditionierten Medien hingegen aus Ko-Kulturen von Tumorstammzellen mit und ohne *knockdown* von *Has2* und stromalen Zellen allein beeinflussen nicht die Proliferation der Tumorstammzellen [38]. Folglich bestünde auch hier die Möglichkeit, dass die induzierte stromale *Has2* erst über einen Umweg ihre Wirkung vermittelt, zum Beispiel durch erhöhte TAM-Rekrutierung und TAM-produzierte Wachstumsfaktoren.

HA ist nicht der einzige mögliche Stimulus, der in Ko-Kultur die Proliferation beeinflussen kann. Zum Beispiel kann CXCL12 aus CAF das Tumorstammzellwachstum über den von Brustkrebszellen exprimierten CXCR4-Rezeptor stimulieren [208]. Allerdings können normale Fibroblasten auch die Proliferation von Tumorzellen hemmen, durch ihre Funktion, Gewebshomöostase herbeizuführen [5]. Zum Beispiel steigert CAF-konditioniertes Medium, nicht aber Medium normaler Fibroblasten die Proliferation, Migration und Invasion von KYSE-30- und KYSE-510-Zellen [177]. Dennoch konnte hier weder in der Ko-Kultur mit SF noch mit CAF eine Induktion der KYSE-410-Zellzahl beobachtet werden. Zusätzlich könnten auch die erwähnten tumorhemmenden Eigenschaften von SF und auch von CAF zum Tragen kommen [9].

Auch die Proliferation von Fibroblasten war weder durch die Ko-Kulturbedingung noch durch den *knockdown* der *Has2* verändert.

An dieser Stelle soll außerdem hervorgehoben werden, dass in dem hier gezeigten Modell Zellen zweier unterschiedlicher Spezies verwendet wurden – mit dem Vorteil, durch speziesspezifische Primer die Genexpression der zwei Zelltypen unterscheiden zu können. Allerdings bedingt das den Nachteil, dass mögliche Rezeptor-Ligand-Interaktionen durch speziesspezifische Unterschiede verloren gehen könnten.

### 4.2.2.3 Untersuchungen zum Einfluss der Hyaluronsäuresynthase 2 auf die Migration von KYSE-410-Zellen und Fibroblasten

HA wurde in der Literatur als migratorischer und invasiver Stimulus beschrieben [26, 33-35, 37]. In ESCC Zellen führte lentiviraler *knockdown* von HAS2 und HAS3 durch Spaltung der FAK zu verminderter Migration [117]. Exogene HA konnte die Migration von Brustkrebs- und Lymphomzellen über Bindung an CD44 und Aktivierung von Tiam1 stimulieren [209, 210]. Da in der Ko-Kultur eine Induktion der *Has2* in Fibroblasten zu beobachten war, wurde folglich untersucht, ob die Ko-Kulturbedingung bzw. die *Has2*-Expression in Fibroblasten Einfluss auf die Migration von KYSE-410-Zellen oder Fibroblasten hatte. Es wurde beschrieben, dass CAF, die mit 4-MU behandelt wurden, eine verminderte intrinsische Migration und weniger Lamellopodien und Filopodien aufzeigten. Die Invasion von Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms in Matrices war vermindert, wenn diese 4-MU-behandelte oder mit shHAS2-transfizierte CAF enthielten [180]. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten war keine verminderte Migration von KYSE-410-Zellen durch *Has2-knockdown* in Fibroblasten nachweisbar. Hier war unter Umständen der Stimulus der von den KYSE-410-Zellen endogen produzierten HA ausreichend für eine maximal durch HA-stimulierbare Migration.

In humanen dermalen Fibroblasten, die durch von Melanomzellen konditioniertem Medium etwas erhöhte migratorische Fähigkeiten besaßen, konnte der *knockdown* von HAS2 die Migration vermindern. Interessanterweise führte der *HAS2-knockdown* in Fibroblasten nicht zu signifikant verminderter Migration unter Kontrollbedingungen [181]. Auch in den hier beschriebenen Messungen der Migrationsgeschwindigkeit konnte kein Unterschied zwischen *Has2-knockdown*- und Kontroll-Fibroblasten in Monokultur festgestellt werden. Allerdings wurde auch unter Ko-Kulturbedingungen kein Unterschied durch den *knockdown* deutlich. Ferner konnte die Anwesenheit der KYSE-410-Zellen die Motilität der Fibroblasten nicht steigern.

Im Gegensatz zu normalen Fibroblasten führen CAF, bzw. CAF-konditioniertes Medium, zum Beispiel im Wundschluss-Assay zu stärkerer Migration von kolorektalen Adenokarzinomzellen [211]. Wie bereits erwähnt, verstärken die Überstände aus ESCC-CAF im Vergleich zu normalen Fibroblasten die Migration und Invasion [177]. Aber auch die Anwesenheit normaler ösophagealer Fibroblasten steigert die Migration der ESCC-Zelllinien TE-11 und KYSE-150 [212]. Fetale Ösophagus-Fibroblasten sowie Ösophagus-CAF produzieren im Vergleich zu fetalen Hautfibroblasten viel HGF, das die Invasion von ESCC-Zellen in organotypischen Matrices fördert [213]. Die verwendeten primären CAF aus

## 4 Diskussion

Xenografttumoren waren in den hier beschriebenen Experimenten hingegen nicht in der Lage, die Migrationsgeschwindigkeit der KYSE-410-Zellen in der Zeitrafferaufnahme signifikant zu verändern.

In dem *in vitro*-Versuchsaufbau der hier vorliegenden Arbeit fehlte möglicherweise eine verstärkte Hyaluronidase-Aktivität, um pro-migratorische Effekte kleiner HA-Fragmente hervorzurufen. Im Tumor hingegen könnte Hyaluronidase-Aktivität durch einen anderen Zelltyp vorhanden sein, zum Beispiel durch Immunzellen. HA-Hexa- und Octamere können die Migration von dermalen Rattenfibroblasten fördern und hochmolekulare HA hemmt sie [214]. Etwa 7 kDa große HA steigert humane Pankreaskarzinomzell-Migration, 1000 kDa HA nicht [215].

### 4.2.2.4 Einfluss der Hyaluronsäuresynthase 2 auf den Myofibroblasten-Phänotyp

In den vorliegenden Experimenten wurde eine Reduktion der  $\alpha$ SMA-Expression in Ko-Kulturen mit HAS2-*knockdown* Fibroblasten im Vergleich zu ihren Kontrollen festgestellt.  $\alpha$ SMA ist ein CAF-Marker, der CAF mit Myofibroblasten-Eigenschaften identifiziert. In ESCC Stadium I und II hatte hohe  $\alpha$ SMA-Expression einen Vorhersagewert für das Überleben der Patienten [212]. Allerdings kann es auch von normalen Fibroblasten exprimiert werden – und muss in CAF nicht immer stärker vorhanden sein als in normalen Fibroblasten [5]. In Ko-Kulturen mit ESCC-Zellen (TE-1, TE-8, TE-10, TE-11 und TE-12) oder mit ESCC-Zell-konditioniertem Medium konnte eine Zunahme von  $\alpha$ SMA in fetalen ösophagealen Fibroblasten beobachtet werden, die vermutlich auf der Stimulation durch TGF- $\beta$  aus den ESCC-Zellen beruhte [216]. TGF- $\beta$  ist neben CXCL12 außerdem ein autokriner Stimulus der Myofibroblasten-Differenzierung [8].

HA ist für eine TGF- $\beta$ -vermittelte Induktion von  $\alpha$ SMA wichtig, denn durch si HAS2 oder Behandlung mit 4-MU wird diese reduziert [217]. Mechanistisch wird die Differenzierung durch HA über eine Interaktion von CD44 und EGFR und Aktivierung von ERK und CaMKII erklärt [218]. Dabei ist eine HAS2-Überexpression allein nicht ausreichend für die Fibroblasten-Differenzierung. Zusätzlich ist eine Stimulation mit TGF- $\beta$  über Smad nötig [219].

In den Ko-Kulturen mit CAF allerdings wurde  $\alpha$ SMA nicht durch die Behandlung mit 4-MU reduziert. Es ist denkbar, dass HA nur einen Einfluss auf die initiale Veränderung des Fibroblasten-Phänotyps hatte, aber weniger auf bereits differenzierte CAF. Möglicherweise hat 4-MU also auch einen modulierenden Einfluss auf das Entstehen von Myofibroblasten-

## 4 Diskussion

CAF im Tumorgeschehen. Sollte 4-MU so den potenziellen Beitrag von Myofibroblasten zur Malignität reduzieren, wären die tumorhemmenden Eigenschaften von 4-MU zum Teil auf eine anti-CAF-Aktivität zurückzuführen. Im murinen Modell des hepatozellulären Karzinoms führte 4-MU zu reduzierter Zahl oder Aktivierung von Myofibroblasten, gemessen an reduziertem  $\alpha$ SMA im Gewebe [48].

Es kann also festgehalten werden, dass die Fibroblasten-*Has2* in der Ko-Kultur zwar keine deutliche Rolle bei der Proliferation oder Migration der Zellen spielte, aber dennoch Einfluss auf den Phänotyp der Fibroblasten, d.h. auf den Gehalt an  $\alpha$ SMA, hatte. Da normale Fibroblasten durch Tumorzell-Überstände oder Ko-Kulturen eine CAF-ähnliche Zytokin- und Chemokin-Signatur bekommen können [220], wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob die Chemokin-Genexpression der Fibroblasten unter Ko-Kulturbedingungen verändert war und ob HA auch bei dieser Phänotypveränderung eine Rolle spielte.

### 4.2.3 Modulation von Chemokinen in der Ko-Kultur

Durch die Ko-Kultur wurde nicht nur die Genexpression von *Has2* sondern auch die der Chemokine *Ccl5* und *Ccl11* sowohl in normalen Hautfibroblasten als auch in CAF moduliert. *Ccl5*-mRNA-Expression wurde induziert während *Ccl11*-mRNA-Expression reduziert wurde.

#### 4.2.3.1 Induktion von CCL5

In soliden Tumoren kann CCL5 von Tumorzellen, Leukozyten, Fibroblasten oder MSC gebildet und sowohl im Primärtumor, in regionalen Lymphknoten, Metastasen oder auch im Serum detektiert werden [221]. Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete CCL5-Induktion in Fibroblasten spiegelt eventuell eine im Tumorgewebe ablaufende Reaktion wider. Passend dazu konnte CCL5-Expression in CAF aus ESCC, Ovarialkarzinomen und NSCLC nachgewiesen werden [177, 222, 223]. Auch im murinen Magenkarzinommodell exprimieren die aus dem Knochenmark zum Tumor rekrutierten mesenchymalen Zellen CCL5 und im murinen Mammakarzinommodell stammt CCL5 aus CAF [224, 225]. Ähnlich wie in dem hier gezeigten Modell kann die Ko-Kultur mit Ovarialkarzinomzellen CCL5-mRNA-Expression in normalen Fibroblasten induzieren. miR-214 ist an dieser Regulation beteiligt [222]. Auch in mesenchymalen Stromal Zellen konnte Osteopontin aus MDA-MB-231-Brustkrebszellen nach 12-24 Stunden in Ko-Kultur CCL5-Expression induzieren [226]. Osteopontin ist wie HA ein negativ geladenes Molekül der EZM, das auch über CD44 seine Effekte vermitteln kann [227].

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Regulation der *Ccl5*-mRNA-Expression in CAF, nicht aber in normalen Hautfibroblasten, von der HA-Synthese abhängig war. Durch 4-MU-Behandlung war die *Ccl5*-mRNA-Expression in Ko-Kulturen im Vergleich zur Kontrollbehandlung reduziert. Dass HA CCL5 induzieren kann, wurde für niedermolekulare HA in Makrophagen gezeigt [56]. Außerdem zeigen mit 4-MU behandelte Mäuse gegenüber der Kontrollbehandlung verminderte *Ccl5*-mRNA-Expression im linken Ventrikel nach Myokardinfarkt [228]. Die Modulation könnte über HA-Rezeptoren CD44, RHAMM oder TLR2 und -4 erfolgen. Für TLR2 und -4 ist bekannt, dass sie CCL5 regulieren können, denn in TLR2-, TLR4- und TLR2/4-*knockout*-Mäusen wurde in Keratinozyten weniger CCL5 gefunden [229]. Die Expression dieser Rezeptoren wurde in humanen Hautfibroblasten auf mRNA-Ebene nachgewiesen [230]. Auch CD44 könnte eine Rolle spielen. In kardialen Fibroblasten konnte IL-6-Stimulation sowohl *Has1*- und *Has2*- als auch *Ccl5*-mRNA induzieren. Nach CD44-*knockdown* war die *Ccl5*-mRNA-Expression allerdings nicht mehr signifikant induziert [231].

CCL5-vermittelte Effekte werden durch Bindung an CCR1, CCR3 und hauptsächlich CCR5 induziert [221]. Außerdem kann CCL5 an Glucosaminoglykan-Seitenketten von CD44 binden und so zu einer ERK1/2-Aktivierung führen [232]. Vor dem Hintergrund, dass in der hier gezeigten Ko-Kultur sowohl CCL5 als auch HA verstärkt exprimiert wurden, wäre interessant, ob sich die beiden Bindungspartner an CD44 gegenseitig verstärken würden. Eine gleichsinnige Regulation von Chemokinen und HA kann zu stärkeren Effekten führen. In der CXCR4-positiven Hepatomzelllinie etwa, führte CXCL12-Behandlung zur Induktion der Migration, die mit hochmolekularer HA noch verstärkt werden konnte, mit HA-Oligosacchariden, die an HA-Rezeptoren antagonistisch wirken, aber gehemmt wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 mit CD44 interagiert [233].

Auch hinsichtlich der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen könnte ein synergistischer Effekt von CCL5 und HA auftreten. Insbesondere können T-Lymphozyten und Monozyten durch CCL5 in den Tumor rekrutiert werden [221]. CAF-Zellkulturüberstände konnten die Chemotaxis von T-Zellen [225] bzw. von tumor-infiltrierenden Th17-Zellen induzieren, die durch neutralisierende CCL5-Antikörper reduziert werden konnte [234]. Durch HA können zum Beispiel Makrophagen rekrutiert [235] und ihre Zyto- und Chemokinexpression induziert werden [55-57]. Im murinen Tumormodell ist HAS2 aus Fibroblasten für eine erhöhte Zahl an TAM verantwortlich [13]. In humanen Brustkrebs-Proben konnte eine Korrelation der HA-Menge und der Anzahl TAM gezeigt werden [236]. Die Behandlung mit niedermolekularer HA erhöht die Zahl CD3+ Lymphozyten im murinen

## 4 Diskussion

Tumor [237]. HA kann auch die Aktivierung der T-Zellen fördern [55]. Darüber hinaus hat HA einen Einfluss auf die Funktion von Treg [238, 239]. Zudem kann HA Kabel-ähnliche Strukturen annehmen, die in der Lage sind, Leukozyten über CD44 zu binden [18]. Sollten diese Eigenschaften im Tumorgewebe vorliegen, könnten die durch CCL5 in den Tumor rekrutierten Leukozyten durch die Form der HA dort besser adhären.

Von CCL5 sind vor allem tumorfördernde Eigenschaften beschrieben. In einem *in vivo*-Kolonkarzinommodell reduzierten CCL5- und CCR5-*knockdown* in immunkompetenten Mäusen das Tumorwachstum mit gleichzeitig verminderter Treg-Infiltration und reduzierter CD8+ T-Zell-Apoptose [240]. In einem *in vivo*-Magenkarzinommodell wurde die Überlebensrate der Mäuse durch anti-CCL5-Antikörperbehandlung verlängert und Magenkarzinomzellen, die mit CCL5 vorbehandelt wurden, induzieren durch direkten Zell-Zell-Kontakt die Apoptose von CD8+ T-Zellen [241]. Interessanterweise führte RNA-Interferenz mit CCL5 in Brustkrebszellen in einem *in vivo*-Modell nicht zu erhöhtem Tumorwachstum oder Metastasierung [242], während ein kompletter CCL5-*knockout* zu geringerem Tumordurchmesser und weniger Lungenmetastasen führte. In diesen CCL5-*knockout*-Mäusen konnten weniger Treg im Tumor detektiert werden, keinen Unterschied gab es zwischen Wildtyp- und *knockout*-Mäusen bezüglich der Zahl der TAM. Außerdem zeigte sich ein veränderter MDSC-Phänotyp von unreiferem Charakter mit reduzierter Fähigkeit, T-Zell-Proliferation zu hemmen [243]. In einem anderen murinen Modell war hingegen CCL5-Überexpression im Tumor mit reduziertem Tumorwachstum und NK, CD4+ und CD8+ T-Zell-Infiltration verbunden [244].

Neben den chemotaktischen Eigenschaften wurden auch direkte Effekte von CCL5 auf Tumorzellen beschrieben. Die durch Ko-Kultur mit Ovariakarzinomzellen induzierten CAF konnten Zellen zweier Ovariakarzinomzelllinien *in vitro* anlocken. Dies wurde durch einen CCL5-Antikörper vermindert [222]. Der CCL5-Rezeptor CCR5 wird in Postatakarzinomzellen, Magenkarzinomzellen und Melanomzellen exprimiert. In Brustkrebszelllinien kann er in einer Subpopulation gefunden werden, die durch erhöhte Migration und Invasivität charakterisiert ist. Genauso waren nur in CD113+ Ovariakarzinom-Stammzellen CCL5 und die Rezeptoren CCR1, -3 und -5 exprimiert, die zu den invasiven Eigenschaften dieser Zellen beitragen [221]. Auch die Stimulation mit durch MSC produziertem CCL5 kann die Brustkrebszell-Invasion und Metastasierung fördern [10]. In Prostata-, Magen- und Kolonkarzinomzellen stimuliert CCL5 die Proliferation. Ebenfalls sind die Invasion und Migration der Tumorzellen durch CCL5 erhöht [221]. In KYSE-410-Zellen konnte hier keine durchgehende CCR5- und CCR3-mRNA-Expression durch qPCR detektiert werden. Nur CCR1-mRNA wurde in allen Proben exprimiert, aber nicht durch die Ko-Kultur reguliert. Direkte Effekte des durch

## 4 Diskussion

Fibroblasten in Ko-Kultur sezernierten CCL5 auf die KYSE-410-Zellen sind somit unwahrscheinlich. Zumindest die Proliferation und Migration der KYSE-410-Zellen waren unter Ko-Kulturbedingungen mit CAF bzw. SF nicht verändert.

Sollte analog zu den *in vitro*-Befunden in Tumoren die *Ccl5*-Genexpression durch 4-MU-Behandlung vermindert sein, wäre dies ein möglicher weiterer Mechanismus über den 4-MU anti-Tumor-Aktivität vermitteln könnte.

### 4.2.3.2 Reduktion von CCL11

Die Ko-Kultur mit KYSE-410-Zellen führte in den Fibroblasten zu einer verminderten *Ccl11*-Genexpression. Auch indirekte Ko-Kultur mit kolorektalen Adenokarzinomzellen führte nach 5 Tagen zur Reduktion der CCL11-Expression in normalen Fibroblasten. Außerdem war CCL11 in gesunder Kolonmukosa stärker exprimiert als im Tumor [211]. Hingegen wird die CCL11-Expression in normalen dermalen Fibroblasten durch Ko-Kultur mit Hodgkin-Zelllinien induziert [245].

Über eine mögliche Rolle von CCL11 im Tumorgeschehen ist nur wenig bekannt. Im Serum von Patienten mit Prostata-, Brust-, Pankreas-, Magen und Kolonkarzinom ist die CCL11-Konzentration im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht, in Patienten mit Ovarial- und Endometriumkarzinom dagegen signifikant erniedrigt [246-248]. CCL11 vermittelt vor allem über CCR3 Effekte. Es initiiert die Chemotaxis von Eosinophilen, aber auch von Basophilen und Th2-Lymphozyten [249, 250].

Für CCL11 wurden sowohl tumorfördernde als auch tumorinhibierende Eigenschaften beschrieben. Es kann die Proliferation, Migration bzw. Invasion von Ovarialkarzinomzellen stimulieren, vermutlich über eine Aktivierung von ERK1/2, MEK1 und STAT3 [247]. Außerdem könnte CCL11 über die Chemotaxis von Endothelzellen die Angiogenese fördern [251].

Tumorinhibierende Eigenschaften von CCL11 wurden in *CCL11-knockout* BALB/c-Mäusen beschrieben, die gegenüber Wildtyp-Mäusen ein signifikant stärkeres 3-Methylcholanthren-induziertes Fibrosarkomwachstum aufzeigten und Eosinophile, die durch CCL11 rekrutiert werden können, induzierten den Tod von Fibrosarkomzellen *in vitro* [252]. In einem murinen Modell mit CCL11-überexprimierenden hepatozellulären Karzinomzellen war das Tumorwachstum initial vergleichbar mit der Kontrolle, führte aber zu einem reduzierten Wachstum ab etwa der 3. Woche. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass LPS-aktivierte Eosinophile den Zelltod von hepatozellulären Karzinomzellen herbeiführen können [253].

## 4 Diskussion

CCL11 wurde außerdem für die Th2-Zell-vermittelte Reduktion von Lungenmetastasen von Melanomzellen im murinen Modell benötigt [254].

In dem hier präsentierten Modell steht wahrscheinlich nicht der direkte Effekt von CCL11 auf KYSE-410-Zellen im Vordergrund, da CCR3, wie bereits erwähnt, nicht durchgehend exprimiert vorlag. In humanen Lungenfibroblasten ist CCR3 exprimiert, über den CCL11 zu verstärkter Fibroblasten-Migration, nicht aber zu einer Induktion des Myofibroblasten-Phänotyps führte [255]. Es ist denkbar, dass die Bedeutung der beobachteten CCL11-Modulation erst in einem *in vivo*-Tumormodell deutlich wird, in dem deutlich mehr Zelltypen als nur Fibroblasten und Tumorzellen das Tumorgeschehen beeinflussen.

### 4.2.4 Limitierung und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Induktion der *Has2* in Fibroblasten in Ko-Kultur mit KYSE-410-Zellen beschränkte sich auf eine Verdopplung der *Has2*-mRNA. Aufgrund nicht verfügbarer speziesspezifischer Antikörper zufriedenstellender Qualität konnte das HAS2-Protein nicht quantifiziert werden. Allerdings legt eine hohe HA-Konzentration im Medium nahe, dass vermutlich vermehrt aktives HAS-Enzym vorlag. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Spezies (murine Fibroblasten, humane KYSE-410-Zellen) könnten mögliche Interaktionseffekte dadurch verloren gegangen sein, dass nicht genügend speziessübergreifende Aktivitäten von Mediatoren wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren bestanden. Die Hautfibroblasten wurden als ein Modell lokaler Gewebsfibroblasten verwendet, die ggf. durch initialen Kontakt zu Karzinomzellen ihren Phänotyp ändern. Sie wurden aus der murinen Haut und nicht aus dem Ösophagus isoliert, um sie bestmöglich mit den CAF aus subkutanen Xenografttumoren vergleichen zu können. Dennoch könnten sich CAF und normale Fibroblasten aus dem Ösophagus anders verhalten. Da die Induktion der *Has2* nur in direkter Ko-Kultur beobachtet werden konnte, mussten die Experimente so konzipiert werden, dass die Analyse zelltypspezifisch erfolgen konnte. Dadurch war das Methodenspektrum eingeschränkt. Außerdem handelt es sich bei den geschilderten Ergebnissen um *in vitro*-Befunde, die sich auf zwei der vielfältigen Zelltypen im Tumorgeschehen beschränkten. Es bleibt offen, ob die gefundenen Prozesse tatsächlich *in vivo* ablaufen und welchen Einfluss sie auf das Tumorgeschehen haben. Die vorliegende Arbeit bildet aber eine Grundlage, um in nachfolgenden *in vivo*-Untersuchungen gezielt die Messergebnisse zu überprüfen.

Zukünftige Untersuchungen könnten klären, ob tatsächlich kanonische Wnt-Signaltransduktion, an deren Ende die Transkriptionsregulation durch LEF1 steht, für die beobachtete *Has2*-Induktion verantwortlich ist und welcher Zelltyp Wnt-Proteine in Ko-Kultur

## 4 Diskussion

bildet. Die tatsächliche Rolle der Fibroblasten-*Has2* ist sicherlich in einem murinen *Has2-knockdown*-Modell deutlicher, in dem auch mögliche Effekte auf Immunzellen detektiert werden könnten. Ob dann auch eine Regulation der Chemokine vorliegt, müsste überprüft werden. Interessant wäre auch, aufzuklären, wie sich die gegenläufige Regulation von CCL5 und CCL11 auf das Immunzellprofil im Tumor auswirkt und welche Folgen das für die Tumorprogression hat.

## **4.3 Kombinationsbehandlung von KYSE-410-Zellen mit Erlotinib und 4-Methylumbelliferon**

### **4.3.1 Wirksamkeit von Erlotinib in KYSE-410-Zellen**

Erlotinib (Tarceva®) war erstmalig im Jahr 2005 zur Therapie des NSCLC verfügbar. Besonders deutlich profitierten in den Studien Patienten mit NSCLC, bei denen aktivierende EGFR-Mutationen vorlagen. Bei diesen ist Erlotinib daher als Erst-Linien-Behandlung zugelassen [132]. Die hier verwendeten KYSE-410-Zellen weisen gemäß der *Roche Cancer Genome Database* TP53 und KRAS-Mutationen auf, nicht aber EGFR-Mutationen [256]. Die Wirkung von 1 µM Erlotinib war in KYSE-410-Zellen daher erwartungsgemäß nicht stark ausgeprägt. Allein die Zellzahl konnte durch Erlotinib nach 3 Tagen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert werden und das Wachstum der MCTS war gegenüber der Kontrolle verlangsamt. Alle anderen hier untersuchten Effekte, bezüglich des Einflusses auf den Zellzyklus, auf die DNA-Synthese, die ERK-/AKT-Phosphorylierung und Migration waren, wenn vorhanden, nur nicht-signifikante Trends. Eine gleichzeitige Behandlung mit 4-MU führte allerdings stets zu signifikanten Unterschieden verglichen mit der Kontroll-Behandlung. Fichter *et al.* berichten von der ESCC-Zelllinie OE-21, in der 1 µM Erlotinib zu einer signifikanten, etwa 50%-igen Reduktion des Anteils der lebenden Zellen führte [257]. Auch die Migration dieser Zellen war durch 1 µM Erlotinib reduziert [258]. Es wurden im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen auch apoptotische Prozesse beobachtet und insbesondere eine verminderte AKT-Phosphorylierung und nicht eine reduzierte ERK-Phosphorylierung gemessen [257]. Hingegen konnten in KYSE-30, -70 und -140-Zellen auch verschiedene Erlotinib-Konzentrationen von bis zu 25 µM keine Apoptose induzieren [259]. In den hier untersuchten KYSE-410-Zellen wurde eine PARP-Spaltung als Zeichen von Apoptose unter Serumentzug und einer Erlotinibkonzentration von 10 µM beobachtet.

### **4.3.2 Wirksamkeit von 4-Methylumbelliferon und Hemmung des Hyaluronsäure-Signalwegs in KYSE-410-Zellen**

Bei der vorliegenden Untersuchung in KYSE-410-Zellen, zeigte die Behandlung mit 300 µM 4-MU keine stark ausgeprägten Effekte. Signifikant reduzierte es die Zellzahl nach 3 Tagen, das Wachstum von MCTS und die ERK-Phosphorylierung in der 3D-Zellkultur. Si RNA gerichtet gegen die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM zeigten nicht-signifikante Trends zu reduzierter Zellzahl. Dies deutet darauf hin, dass der durch HA stimulierte Effekt über mehrere Signalwege vermittelt wird, und gegebenenfalls Gegenregulationsmechanismen beim Ausschalten eines Signalwegs greifen. Weiterhin konnten nicht-signifikante Trends zu einem erhöhten Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase und einem erniedrigten Anteil in der S-

## 4 Diskussion

Phase, sowie geringerer DNA-Synthese und erniedrigter Migrationsgeschwindigkeit unter Behandlung mit 4-MU detektiert werden. In der ESCC-Zelllinie OSC1 führte 4-MU zu signifikant reduziertem <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Einbau und reduziertem Phospho-ERK. Auch die Migration war signifikant verringert [117]. Neben OSC1-Zellen verminderte 4-MU auch die Migration in Osteosarkom- [118], Prostatakarzinom- [51] und Brustkrebszellen [260]. 4-MU hemmte außerdem auch die AKT-Phosphorylierung [51, 118, 119, 257], welches unter den beschriebenen Bedingungen in KYSE-410-Zellen nicht beobachtet werden konnte. Offensichtlich war die HA-Synthese der HAS2 für anti-apoptotische Signale nötig, denn si HAS2 induzierte die PARP-Spaltung. In J82 Blasen tumorzellen, führte si HAS3 zu erhöhter PARP-Spaltung [206]. Und in anderen Zellen wies 4-MU pro-apoptotische Effekte auf [51, 119]. Dies stimmt mit Befunden überein, dass HA pro-proliferative und pro-migratorische Phänotypen induziert und für das Überleben der Zellen wichtig ist [26, 35, 174, 261]. In den hier vorgestellten Experimenten konnten solch deutliche Effekte teilweise erst unter Kombination mit Erlotinib erreicht werden.

Interessanterweise scheint in KYSE-410-Zellen der HA-Synthese-hemmende Effekt von 4-MU auf die ERK-Phosphorylierung besonders im 3D-Zellkultur-System deutlich zu werden. Hier war unter 4-MU-Behandlung signifikant weniger ERK phosphoryliert. In der 2D-Kultur konnte dieser Effekt allerdings nicht durchgehend beobachtet werden. Das 3D-Arrangement von HA scheint für aktivierende Signale in KYSE-410-Zellen von großer Bedeutung zu sein. Betrachtet man die Einflüsse der beiden untersuchten HA-Rezeptoren RHAMM und CD44, so war die Kombination von si CD44 und Erlotinib der reinen Erlotinib-Behandlung gegenüber überlegen, während si RHAMM plus Erlotinib gegenüber Erlotinib allein nicht die Zellzahl weiter reduzierte. Auch im Hinblick auf die Apoptose bewirkte si CD44 einen nicht-signifikanten Trend hin zu mehr Apoptose in Kombination mit Erlotinib. Dagegen zeigte si RHAMM diesen Trend nicht. *Knockdown* von sowohl CD44 als auch RHAMM führten in OSC1-Zellen zu verminderter Migration, DNA-Synthese, ERK- und AKT-Phosphorylierung. Allerdings war die FAK-Spaltung besonders den Effekten von RHAMM und nicht denen von CD44 zuzuordnen [117].

### 4.3.3 Mögliche Mechanismen der synergistischen Wirkung von 4-Methylumbelliferon und Erlotinib

Während 4-MU oder Erlotinib allein nicht durchgängig Effekte auf Wachstum und Migration von KYSE-410-Zellen zeigten, konnte sich ihre Kombination stets signifikant von der Kontroll-Behandlung unterscheiden. Im Hinblick auf die Beeinflussung der Zellzahl erwies sich die Kombination als synergistisch, berechnet mit der Methode von Chou [152]. Für manche Zelllinien ist gezeigt, dass EGFR und CD44 interagieren und CD44 EGFR aktiviert [262-265]. Folglich könnte eine gleichzeitige Hemmung von EGFR und CD44 eine verstärkte

## 4 Diskussion

Hemmung EGFR-vermittelter Signaltransduktion bedeuten. Außerdem kann CD44 noch mit anderen Rezeptoren interagieren, wie PDGFR, c-Met, ErbB2 and TGFR1 oder Zytosklettproteinen wie Ankyrin oder Adapterproteinen oder GTPasen wie zum Beispiel RhoA, Rac1 [105, 264]. Diese könnten bei EGFR-Hemmung für anhaltende pro-proliferative und pro-migratorische Signaltransduktion verantwortlich sein. Eine Hemmung von CD44 würde dem entgegenwirken. Gleichzeitig würde eine HA-Synthese-Hemmung durch 4-MU nicht nur die Signaltransduktion über CD44 hemmen, sondern auch über andere HA-Rezeptoren wie RHAMM. Damit wären mehrere Angriffspunkte blockiert und eine stärkere Inhibition ist zu erwarten.

### 4.3.4 Limitierung und Ausblick

Die Untersuchungen zum Synergismus der anti-proliferativen Wirkung von Erlotinib und 4-MU wurden durch Zählen der Zellen durchgeführt. Dies ist eine einfache Methode, dennoch könnten Zellviabilitätstests wie der MTT-Test, bei dem der entstehende Farbstoff Formazan quantifiziert wird, eine geringere Streuung aufweisen, sodass Effekte sogar noch deutlicher erkennbar würden. Bei diesem Testverfahren könnte man sowohl si RNA-Transfektion als auch die Behandlung mit 4-MU parallel durchführen, um gleichzeitig Effekte einer generellen HA-Synthese-Hemmung und dem gezielten *knockdown* von Zielgenen des HA-Systems vergleichen zu können. Auch in den im dritten Teil der Arbeit durchgeführten Experimenten handelt es sich um Untersuchungen *in vitro*. Zur Bestätigung der Wirksamkeit in einem komplexeren Zusammenhang sind daher *in vivo*-Experimente erforderlich. Außerdem könnte untersucht werden, ob 4-MU positive Effekte auf den Erhalt der Erlotinib-Sensitivität hätte, denn in NSCLC-Zellen reduzierte HA die EGFR-TKI-Sensitivität [45]. Da KYSE-410-Zellen keine aktivierende EGFR-Mutationen aufweisen, wäre es interessant festzustellen, ob 4-MU auch in Zellen mit diesen Mutationen, zum Beispiel in NSCLC Zellen, die anti-proliferativen Effekte von Erlotinib verstärken könnte. Ebenso wäre es für einen möglichen therapeutischen Nutzen zu prüfen, ob 4-MU neben Erlotinib und Sorafenib [51] auch andere zur Tumorthherapie zugelassene Kinase-Inhibitoren oder auch die Standardtherapie des ESCC verstärken würde. Zudem bleibt der genaue Mechanismus des Synergismus zwischen HA-System und Erlotinib zu untersuchen.

### 5 Zusammenfassung

Maligne Tumore des Ösophagus sind mit einer schlechten Prognose assoziiert, sodass es von Interesse ist, neue therapeutische Ansätze zu identifizieren. Ein Eingriff in die Synthese von Hyaluronsäure (HA) könnte zielführend sein, da diese in manchen Tumoren mit einem verkürzten Überleben verbunden ist. Zudem wird die Tumorprogression in murinen Modellen durch *knockout* von HA-Synthase (HAS)-Isoformen gehemmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Adenokarzinomen des Ösophagus exprimierte kurze Splicevariante der HAS3 (HAS3b) im Hinblick auf eine Oligomerbildung und auf ihren Einfluss auf die HA-Synthese untersucht. Im zweiten Teil wurde die Rolle der HA-Synthese bei der Interaktion von Fibroblasten mit Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus, KYSE-410-Zellen, analysiert. Der dritte Teil befasst sich mit der Wirkung der Kombination aus dem HA-Synthese-Inhibitor 4-Methylumbelliferon (4-MU) und dem EGF-Rezeptor (EGFR)-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib auf KYSE-410-Zellkulturen.

Es konnte gezeigt werden, dass HAS3b sowohl Homo- als auch Heterooligomere bildete. HAS3b-Expression führte allein nicht zu einer erhöhten extrazellulären HA-Konzentration und beeinflusste auch nicht die Syntheseleistung von HAS2 und HAS3a nach Doppeltransfektion.

In direkter Ko-Kultur induzierten KYSE-410-Zellen die Expression von *Has2*-mRNA sowohl in Hautfibroblasten (SF), als auch in tumorassoziierten Fibroblasten (CAF). Eine räumliche Trennung der KYSE-410-Zellen sowie *knockdown* von LEF1 verhinderte die *Has2*-Induktion in SF. In SF und CAF wurde zudem die mRNA-Expression des Chemokins *Ccl5* induziert und *Ccl11* reduziert. Eine Hemmung der HA-Synthese mit 4-MU erniedrigte die *Ccl5*- und erhöhte die *Ccl11*-mRNA-Expression in CAF-Ko-Kulturen. Außerdem wurde in Ko-Kultur mit SF durch *Has2*-*knockdown* vermindert  $\alpha$ -Glattmuskelaktin gebildet; dies weist auf einen weniger stark ausgeprägten Myofibroblasten-Phänotyp hin.

4-MU und Erlotinib reduzierten synergistisch die KYSE-410-Zellzahl. Die Kombination führte neben der Reduktion der Proliferation zu verminderter Migrationsgeschwindigkeit der Zellen und zu einem gehemmten Wachstum in 3D-Zellkultur. Es wurde auch eine verminderte ERK-Phosphorylierung gemessen.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte zur Rolle von HA und HAS-Isoformen im Ösophaguskarzinom untersucht. Die Funktion der HAS3b liegt möglicherweise außerhalb einer Beeinflussung der Synthese extrazellulärer HA. *Has2* der Fibroblasten moduliert den Myofibroblasten-Phänotyp und unter Umständen auch die Tumorimmunantwort zusammen mit ebenfalls regulierten Chemokinen. Ein neuer Therapieansatz für das Ösophaguskarzinom könnte aus der Kombination des HA-Synthese-Hemmers 4-MU, mit der Inhibition des EGFR, zum Beispiel durch Erlotinib, bestehen.

### 6 Summary

Patients with esophageal cancer have a very poor survival. Hence, there is a demand for new treatment options. Interfering with hyaluronan (HA) synthesis is a promising approach as HA is associated with a poor prognosis in various tumours, and knockdown of HA synthase (HAS) isoforms reportedly inhibits tumour progression in mice.

The aim of this thesis was to investigate the role of HA in the context of esophageal carcinoma. In the first part of the thesis, it was examined if the short splice variant of HAS3 (HAS3b) that was found in esophageal adenocarcinoma formed oligomers and whether oligomerisation interfered with HA synthesis by other HAS isoforms. The second part deals with the role of HA in the interaction of an esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-410) and fibroblasts. Finally, the impact of combined inhibition of HA-synthesis by 4-methylumbelliferone (4-MU) and inhibition of the EGF receptor (EGFR) tyrosine kinase by erlotinib was evaluated *in vitro*.

In transfected cells, HAS3b formed homooligomers and heterooligomers with HAS1, HAS2 and HAS3a. Overexpression of HAS3b did not result in an increased amount of extracellular HA and did not affect HA production by HAS2 and HAS3a in double-transfected cells.

Direct co-culture with KYSE-410 induced *Has2* mRNA expression in both skin fibroblasts (SF) and cancer associated fibroblasts (CAF). In SF, *Has2* was no longer induced in indirect co-cultures or when *Lef1* expression was reduced by si RNA. Additionally, *Ccl5* mRNA was increased and *Ccl11* mRNA was decreased in SF and CAF in co-culture with KYSE-410. In co-cultures of CAF with KYSE-410, 4-MU treatment reduced *Ccl5* and increased *Ccl11* mRNA expression. Furthermore, *Has2* knockdown in SF reduced the expression of the myofibroblast marker  $\alpha$  smooth muscle actin in co-cultures of SF and KYSE-410.

In KYSE-410 monocultures, the combination of erlotinib and 4-MU synergistically reduced the number of cells. This could be attributed to reduced proliferation. In addition, cell migration and the growth of multicellular tumour spheroids in 3D cell-culture were decreased by erlotinib and 4-MU. Furthermore, the combination effectively reduced ERK phosphorylation.

In this thesis, the possible roles of HA synthesis and HAS isoforms in esophageal carcinoma were investigated. The contribution of HAS3b remains to be elucidated as it did not interfere with extracellular HA synthesis. *Has2* expressed by fibroblasts is important for a myofibroblast phenotype and in combination with the chemokines that are regulated in co-culture it may have an impact on the tumour immune response. Inhibition of both HA synthesis by 4-MU and EGFR by erlotinib may be a promising treatment option for esophageal carcinoma.

## Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (Hrsg.). Gesundheit - Todesursachen in Deutschland 2013. Fachserie 12 Reihe 4. Wiesbaden: 2014.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
3. Dai G. Functional analysis of human hyaluronan synthase 3 splicing variant 2 [Dissertation]: Universität Duisburg-Essen; 2010.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
5. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014;211(8):1503-23.
6. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2012;21(3):309-22.
7. Servais C, Erez N. From sentinel cells to inflammatory culprits: cancer-associated fibroblasts in tumour-related inflammation. *J Pathol*. 2013;229(2):198-207.
8. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res*. 2011;1(4):482-97.
9. Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol*. 2014;4:62.
10. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449(7162):557-63.
11. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer cell*. 2010;17(2):135-47.
12. Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*. 2013;138(2):105-15.
13. Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T, Koyama H, Kitazawa M, Takeoka M, et al. Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res*. 2010;70(18):7073-83.

## Literaturverzeichnis

14. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67.
15. Moustakas A, Heldin P. TGFbeta and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2621-34.
16. Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2452-9.
17. Erickson M, Stern R. Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem Res Int*. 2012;2012:893947.
18. Tammi RH, Passi AG, Rilla K, Karousou E, Vigetti D, Makkonen K, et al. Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis. *Febs J*. 2011;278(9):1419-28.
19. Itano N, Sawai T, Atsumi F, Miyaishi O, Taniguchi S, Kannagi R, et al. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J Biol Chem*. 2004;279(18):18679-87.
20. Itano N. Hyaluronan: A Key Microenvironmental Mediator of Tumor-Stromal Cell Interactions. In: Mueller MM, Fusenig NE (Hrsg.). *Tumor associated fibroblasts and their matrix*. Heidelberg: Springer; 2011. 127-44.
21. Schmaus A, Klusmeier S, Rothley M, Dimmler A, Sipos B, Faller G, et al. Accumulation of small hyaluronan oligosaccharides in tumour interstitial fluid correlates with lymphatic invasion and lymph node metastasis. *Br J Cancer*. 2014;111(3):559-67.
22. Voelcker V, Gebhardt C, Averbek M, Saalbach A, Wolf V, Weih F, et al. Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4. *Exp Dermatol*. 2008;17(2):100-7.
23. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 2002;195(1):99-111.
24. Alaniz L, Garcia MG, Gallo-Rodriguez C, Agusti R, Sterin-Speziale N, Hajos SE, et al. Hyaluronan oligosaccharides induce cell death through PI3-K/Akt pathway independently of NF-kappaB transcription factor. *Glycobiology*. 2006;16(5):359-67.
25. Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*. 2002;277(41):38013-20.

## Literaturverzeichnis

26. Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T, et al. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3609-14.
27. Tian X, Azpurua J, Hine C, Vaidya A, Myakishev-Rempel M, Ablueva J, et al. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature*. 2013;499(7458):346-9.
28. Manov I, Hirsh M, Iancu TC, Malik A, Sotnichenko N, Band M, et al. Pronounced cancer resistance in a subterranean rodent, the blind mole-rat, *Spalax*: in vivo and in vitro evidence. *BMC Biol*. 2013;11:91.
29. Bharadwaj AG, Kovar JL, Loughman E, Elowsky C, Oakley GG, Simpson MA. Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing. *Am J Pathol*. 2009;174(3):1027-36.
30. Bharadwaj AG, Rector K, Simpson MA. Inducible hyaluronan production reveals differential effects on prostate tumor cell growth and tumor angiogenesis. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20561-72.
31. Simpson MA. Concurrent expression of hyaluronan biosynthetic and processing enzymes promotes growth and vascularization of prostate tumors in mice. *Am J Pathol*. 2006;169(1):247-57.
32. Twarock S, Freudenberger T, Poscher E, Dai G, Jannasch K, Dullin C, et al. Inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma progression by in vivo targeting of hyaluronan synthesis. *Mol Cancer*. 2011;10:30.
33. Golshani R, Lopez L, Estrella V, Kramer M, Iida N, Lokeshwar VB. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. *Cancer Res*. 2008;68(2):483-91.
34. Udabage L, Brownlee GR, Waltham M, Blick T, Walker EC, Heldin P, et al. Antisense-mediated suppression of hyaluronan synthase 2 inhibits the tumorigenesis and progression of breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(14):6139-50.
35. Liu N, Gao F, Han Z, Xu X, Underhill CB, Zhang L. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61(13):5207-14.
36. Teng BP, Heffler MD, Lai EC, Zhao YL, LeVeau CM, Golubovskaya VM, et al. Inhibition of hyaluronan synthase-3 decreases subcutaneous colon cancer growth by increasing apoptosis. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011;11(7):620-8.
37. Li Y, Li L, Brown TJ, Heldin P. Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2007;120(12):2557-67.

## Literaturverzeichnis

38. Okuda H, Kobayashi A, Xia B, Watabe M, Pai SK, Hirota S, et al. Hyaluronan synthase HAS2 promotes tumor progression in bone by stimulating the interaction of breast cancer stem-like cells with macrophages and stromal cells. *Cancer Res.* 2012;72(2):537-47.
39. Koyama H, Hibi T, Isogai Z, Yoneda M, Fujimori M, Amano J, et al. Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M. *Am J Pathol.* 2007;170(3):1086-99.
40. Simpson MA, Wilson CM, McCarthy JB. Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice. *Am J Pathol.* 2002;161(3):849-57.
41. Zoltan-Jones A, Huang L, Ghatak S, Toole BP. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45801-10.
42. Misra S, Obeid LM, Hannun YA, Minamisawa S, Berger FG, Markwald RR, et al. Hyaluronan constitutively regulates activation of COX-2-mediated cell survival activity in intestinal epithelial and colon carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2008;283(21):14335-44.
43. Li Y, Heldin P. Hyaluronan production increases the malignant properties of mesothelioma cells. *Br J Cancer.* 2001;85(4):600-7.
44. Porsch H, Bernert B, Mehic M, Theocharis AD, Heldin CH, Heldin P. Efficient TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition depends on hyaluronan synthase HAS2. *Oncogene.* 2013;32(37):4355-65.
45. Chow G, Tauler J, Mulshine JL. Cytokines and growth factors stimulate hyaluronan production: role of hyaluronan in epithelial to mesenchymal-like transition in non-small cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:485468.
46. Bharadwaj AG, Goodrich NP, McAtee CO, Haferbier K, Oakley GG, Wahl JK, 3rd, et al. Hyaluronan suppresses prostate tumor cell proliferation through diminished expression of N-cadherin and aberrant growth factor receptor signaling. *Exp Cell Res.* 2011;317(8):1214-25.
47. Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, Olmeda D, Cubillo E, Santos V, et al. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc.* 2009;4(11):1591-613.
48. Piccioni F, Malvicini M, Garcia MG, Rodriguez A, Atorrasagasti C, Kippes N, et al. Antitumor effects of hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone in an orthotopic hepatocellular carcinoma model in mice. *Glycobiology.* 2012;22(3):400-10.

## Literaturverzeichnis

49. Meran S, Thomas D, Stephens P, Martin J, Bowen T, Phillips A, et al. Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype. *J Biol Chem.* 2007;282(35):25687-97.
50. Bourguignon LY, Wong G, Earle CA, Xia W. Interaction of low molecular weight hyaluronan with CD44 and toll-like receptors promotes the actin filament-associated protein 110-actin binding and MyD88-NFkappaB signaling leading to proinflammatory cytokine/chemokine production and breast tumor invasion. *Cytoskeleton.* 2011;68(12):671-93.
51. Lokeshwar VB, Lopez LE, Munoz D, Chi A, Shirodkar SP, Lokeshwar SD, et al. Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2010;70(7):2613-23.
52. Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Scuruchi M, Prestipino V, Calatroni A, et al. 6-Mer hyaluronan oligosaccharides increase IL-18 and IL-33 production in mouse synovial fibroblasts subjected to collagen-induced arthritis. *Innate Immun.* 2012;18(5):675-84.
53. David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B, Vincent JC, Bogdanowicz P, Boumediene K, et al. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(2):274-87.
54. Vistejnova L, Safrankova B, Nesporova K, Slavkovsky R, Hermannova M, Hosek P, et al. Low molecular weight hyaluronan mediated CD44 dependent induction of IL-6 and chemokines in human dermal fibroblasts potentiates innate immune response. *Cytokine.* 2014;70(2):97-103.
55. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol.* 2006;177(2):1272-81.
56. Hodge-Dufour J, Noble PW, Horton MR, Bao C, Wysoka M, Burdick MD, et al. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J Immunol.* 1997;159(5):2492-500.
57. Black KE, Collins SL, Hagan RS, Hamblin MJ, Chan-Li Y, Hallowell RW, et al. Hyaluronan fragments induce IFNbeta via a novel TLR4-TRIF-TBK1-IRF3-dependent pathway. *J Inflamm (Lond).* 2013;10(1):23.
58. de la Motte C, Nigro J, VasANJI A, Rho H, Kessler S, Bandyopadhyay S, et al. Platelet-derived hyaluronidase 2 cleaves hyaluronan into fragments that trigger monocyte-mediated production of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol.* 2009;174(6):2254-64.
59. Auvinen P, Tammi R, Parkkinen J, Tammi M, Agren U, Johansson R, et al. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *Am J Pathol.* 2000;156(2):529-36.

## Literaturverzeichnis

60. Pirinen R, Tammi R, Tammi M, Hirvikoski P, Parkkinen JJ, Johansson R, et al. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2001;95(1):12-7.
61. Böhm J, Niskanen L, Tammi R, Tammi M, Eskelinen M, Pirinen R, et al. Hyaluronan expression in differentiated thyroid carcinoma. *J Pathol*. 2002;196(2):180-5.
62. Ropponen K, Tammi M, Parkkinen J, Eskelinen M, Tammi R, Lipponen P, et al. Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(2):342-7.
63. Setälä LP, Tammi MI, Tammi RH, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Agren UM, et al. Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate. *Br J Cancer*. 1999;79(7-8):1133-8.
64. Ikuta K, Urakawa H, Kozawa E, Arai E, Zhuo L, Futamura N, et al. Hyaluronan expression as a significant prognostic factor in patients with malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Exp Metastasis*. 2014;31(6):715-25.
65. Cheng XB, Sato N, Kohi S, Yamaguchi K. Prognostic impact of hyaluronan and its regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*. 2013;8(11):e80765.
66. Wang C, Tammi M, Guo H, Tammi R. Hyaluronan distribution in the normal epithelium of esophagus, stomach, and colon and their cancers. *Am J Pathol*. 1996;148(6):1861-9.
67. Kosunen A, Ropponen K, Kellokoski J, Pukkila M, Virtaniemi J, Valtonen H, et al. Reduced expression of hyaluronan is a strong indicator of poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2004;40(3):257-63.
68. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*. 1997;272(22):13997-4000.
69. Rilla K, Siiskonen H, Spicer AP, Hyttinen JM, Tammi MI, Tammi RH. Plasma membrane residence of hyaluronan synthase is coupled to its enzymatic activity. *J Biol Chem*. 2005;280(36):31890-7.
70. Ghosh A, Kuppusamy H, Pilarski LM. Aberrant splice variants of HAS1 (Hyaluronan Synthase 1) multimerize with and modulate normally spliced HAS1 protein: a potential mechanism promoting human cancer. *J Biol Chem*. 2009;284(28):18840-50.
71. Itano N, Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB life*. 2002;54(4):195-9.

## Literaturverzeichnis

72. Hubbard C, McNamara JT, Azumaya C, Patel MS, Zimmer J. The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *J Mol Biol.* 2012;418(1-2):21-31.
73. Schulz T, Schumacher U, Prehm P. Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP. *J Biol Chem.* 2007;282(29):20999-1004.
74. Hagenfeld D, Borkenhagen B, Schulz T, Schillers H, Schumacher U, Prehm P. Hyaluronan export through plasma membranes depends on concurrent K<sup>+</sup> efflux by K(ir) channels. *PLoS One.* 2012;7(6):e39096.
75. Thomas NK, Brown TJ. ABC transporters do not contribute to extracellular translocation of hyaluronan in human breast cancer in vitro. *Exp Cell Res.* 2010;316(7):1241-53.
76. Karousou E, Kamiryo M, Skandalis SS, Ruusala A, Asteriou T, Passi A, et al. The activity of hyaluronan synthase 2 is regulated by dimerization and ubiquitination. *J Biol Chem.* 2010;285(31):23647-54.
77. Chao H, Spicer AP. Natural antisense mRNAs to hyaluronan synthase 2 inhibit hyaluronan biosynthesis and cell proliferation. *J Biol Chem.* 2005;280(30):27513-22.
78. Michael DR, Phillips AO, Krupa A, Martin J, Redman JE, Altaher A, et al. The human hyaluronan synthase 2 (HAS2) gene and its natural antisense RNA exhibit coordinated expression in the renal proximal tubular epithelial cell. *J Biol Chem.* 2011;286(22):19523-32.
79. Vigetti D, Deleonibus S, Moretto P, Bowen T, Fischer JW, Grandoch M, et al. Natural antisense transcript for hyaluronan synthase 2 (HAS2-AS1) induces transcription of HAS2 via protein O-GlcNAcylation. *J Biol Chem.* 2014;289(42):28816-26.
80. Kuroda Y, Kasai K, Nanashima N, Nozaka H, Nakano M, Chiba M, et al. 4-Methylumbelliferone inhibits the phosphorylation of hyaluronan synthase 2 induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Biomed Res.* 2013;34(2):97-103.
81. Vigetti D, Viola M, Karousou E, De Luca G, Passi A. Metabolic control of hyaluronan synthases. *Matrix Biol.* 2014;35:8-13.
82. Ontong P, Hatada Y, Taniguchi S, Kakizaki I, Itano N. Effect of a cholesterol-rich lipid environment on the enzymatic activity of reconstituted hyaluronan synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(2):666-71.
83. Sakr SW, Potter-Perigo S, Kinsella MG, Johnson PY, Braun KR, Goueffic Y, et al. Hyaluronan accumulation is elevated in cultures of low density lipoprotein receptor-deficient cells and is altered by manipulation of cell cholesterol content. *J Biol Chem.* 2008;283(52):36195-204.

## Literaturverzeichnis

84. Törrönen K, Nikunen K, Kärnä R, Tammi M, Tammi R, Rilla K. Tissue distribution and subcellular localization of hyaluronan synthase isoenzymes. *Histochem Cell Biol.* 2014;141(1):17-31.
85. Tien JY, Spicer AP. Three vertebrate hyaluronan synthases are expressed during mouse development in distinct spatial and temporal patterns. *Dev Dyn.* 2005;233(1):130-41.
86. Camenisch TD, Schroeder JA, Bradley J, Klewer SE, McDonald JA. Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors. *Nat Med.* 2002;8(8):850-5.
87. Bai KJ, Spicer AP, Mascarenhas MM, Yu L, Ochoa CD, Garg HG, et al. The role of hyaluronan synthase 3 in ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(1):92-8.
88. Rilla K, Oikari S, Jokela TA, Hyttinen JM, Kärnä R, Tammi RH, et al. Hyaluronan synthase 1 (HAS1) requires higher cellular UDP-GlcNAc concentration than HAS2 and HAS3. *J Biol Chem.* 2013;288(8):5973-83.
89. Siiskonen H, Kärnä R, Hyttinen JM, Tammi RH, Tammi MI, Rilla K. Hyaluronan synthase 1 (HAS1) produces a cytokine-and glucose-inducible, CD44-dependent cell surface coat. *Exp Cell Res.* 2014;320(1):153-63.
90. Adamia S, Treon SP, Reiman T, Tournilhac O, McQuarrie C, Mant MJ, et al. Potential impact of a single nucleotide polymorphism in the hyaluronan synthase 1 gene in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clinical lymphoma.* 2005;5(4):253-6.
91. Golshani R, Hautmann SH, Estrella V, Cohen BL, Kyle CC, Manoharan M, et al. HAS1 expression in bladder cancer and its relation to urinary HA test. *Int J Cancer.* 2007;120(8):1712-20.
92. Kriangkum J, Warkentin A, Belch AR, Pilarski LM. Alteration of introns in a hyaluronan synthase 1 (HAS1) minigene convert Pre-mRNA [corrected] splicing to the aberrant pattern in multiple myeloma (MM): MM patients harbor similar changes. *PLoS One.* 2013;8(1):e53469.
93. Adamia S, Reiman T, Crainie M, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM. Intronic splicing of hyaluronan synthase 1 (HAS1): a biologically relevant indicator of poor outcome in multiple myeloma. *Blood.* 2005;105(12):4836-44.
94. Pruitt KD, Brown GR, Hiatt SM, Thibaud-Nissen F, Astashyn A, Ermolaeva O, et al. RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D756-63.
95. Sayo T, Sugiyama Y, Takahashi Y, Ozawa N, Sakai S, Ishikawa O, et al. Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2002;118(1):43-8.

## Literaturverzeichnis

96. Monslow J, Williams JD, Norton N, Guy CA, Price IK, Coleman SL, et al. The human hyaluronan synthase genes: genomic structures, proximal promoters and polymorphic microsatellite markers. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(8):1272-83.
97. Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D749-55.
98. Slomiany MG, Dai L, Tolliver LB, Grass GD, Zeng Y, Toole BP. Inhibition of Functional Hyaluronan-CD44 Interactions in CD133-positive Primary Human Ovarian Carcinoma Cells by Small Hyaluronan Oligosaccharides. *Clin Cancer Res.* 2009;15(24):7593-601.
99. Slomiany MG, Dai L, Bomar PA, Knackstedt TJ, Kranc DA, Tolliver L, et al. Abrogating drug resistance in malignant peripheral nerve sheath tumors by disrupting hyaluronan-CD44 interactions with small hyaluronan oligosaccharides. *Cancer Res.* 2009;69(12):4992-8.
100. Jiang P, Li X, Thompson CB, Huang Z, Araiza F, Osgood R, et al. Effective targeting of the tumor microenvironment for cancer therapy. *Anticancer Res.* 2012;32(4):1203-12.
101. Thompson CB, Shepard HM, O'Connor PM, Kadhim S, Jiang P, Osgood RJ, et al. Enzymatic depletion of tumor hyaluronan induces antitumor responses in preclinical animal models. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(11):3052-64.
102. Shuster S, Frost GI, Csoka AB, Formby B, Stern R. Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. *Int J Cancer.* 2002;102(2):192-7.
103. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell.* 2012;21(3):418-29.
104. Benitez A, Yates TJ, Lopez LE, Cerwinka WH, Bakkar A, Lokeshwar VB. Targeting hyaluronidase for cancer therapy: antitumor activity of sulfated hyaluronic acid in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2011;71(12):4085-95.
105. Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR, et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *Febs J.* 2011;278(9):1429-43.
106. Wallach-Dayana SB, Rubinstein AM, Hand C, Breuer R, Naor D. DNA vaccination with CD44 variant isoform reduces mammary tumor local growth and lung metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(6):1615-23.
107. Zou L, Song X, Yi T, Li S, Deng H, Chen X, et al. Administration of PLGA nanoparticles carrying shRNA against focal adhesion kinase and CD44 results in enhanced antitumor effects against ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* 2013;20(4):242-50.

## Literaturverzeichnis

108. Borjesson PK, Postema EJ, Roos JC, Colnot DR, Marres HA, van Schie MH, et al. Phase I therapy study with (186)Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(10 Pt 2):3961S-72S.
109. Rupp U, Schoendorf-Holland E, Eichbaum M, Schuetz F, Lauschner I, Schmidt P, et al. Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer: final results of a phase I study. *Anti-cancer drugs.* 2007;18(4):477-85.
110. Koppe M, Schaijk F, Roos J, Leeuwen P, Heider KH, Kuthan H, et al. Safety, pharmacokinetics, immunogenicity, and biodistribution of (186)Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (Bivatuzumab) in patients with early-stage breast cancer. *Cancer Biother Radiopharm.* 2004;19(6):720-9.
111. Tijink BM, Buter J, de Bree R, Giaccone G, Lang MS, Staab A, et al. A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus. *Clin Cancer Res.* 2006;12(20 Pt 1):6064-72.
112. Gonzalo-Garijo MA, Revenga-Arranz F, Moneo-Goiri I. Anaphylactic-type reaction to hymecromone. *Allergy.* 1996;51(6):442-3.
113. Sticher O. Phenolische Verbindungen. In: Hänsel R, Sticher O (Hrsg.). *Pharmakognosie - Phytopharmazie.* 9.Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2010. 1051-206.
114. Morohashi H, Kon A, Nakai M, Yamaguchi M, Kakizaki I, Yoshihara S, et al. Study of hyaluronan synthase inhibitor, 4-methylumbelliferone derivatives on human pancreatic cancer cell (KP1-NL). *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345(4):1454-9.
115. Kakizaki I, Kojima K, Takagaki K, Endo M, Kannagi R, Ito M, et al. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem.* 2004;279(32):33281-9.
116. Kultti A, Pasonen-Seppänen S, Jauhiainen M, Rilla KJ, Kärnä R, Pyoria E, et al. 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. *Exp Cell Res.* 2009;315(11):1914-23.
117. Twarock S, Tammi MI, Savani RC, Fischer JW. Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2010;285(30):23276-84.
118. Arai E, Nishida Y, Wasa J, Urakawa H, Zhuo L, Kimata K, et al. Inhibition of hyaluronan retention by 4-methylumbelliferone suppresses osteosarcoma cells in vitro and lung metastasis in vivo. *Br J Cancer.* 2011;105(12):1839-49.
119. Urakawa H, Nishida Y, Wasa J, Arai E, Zhuo L, Kimata K, et al. Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-methylumbelliferone

## Literaturverzeichnis

- suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo. *Int J Cancer*. 2012;130(2):454-66.
120. Edward M, Quinn JA, Pasonen-Seppänen SM, McCann BA, Tammi RH. 4-Methylumbelliferone inhibits tumour cell growth and the activation of stromal hyaluronan synthesis by melanoma cell-derived factors. *Br J Dermatol*. 2010;162(6):1224-32.
  121. Nakazawa H, Yoshihara S, Kudo D, Morohashi H, Kakizaki I, Kon A, et al. 4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;57(2):165-70.
  122. Benitez A, Yates TJ, Shamaldevi N, Bowen T, Lokeshwar VB. Dietary supplement hycromone and sorafenib: a novel combination for the control of renal cell carcinoma. *J Urol*. 2013;190(1):285-90.
  123. Palyi-Krekk Z, Barok M, Isola J, Tammi M, Szollosi J, Nagy P. Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer*. 2007;43(16):2423-33.
  124. Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Cancer stem-like cell marker CD44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility, and hyaluronan production. *Cancer Res*. 2013;73(13):4112-22.
  125. Yoshihara S, Kon A, Kudo D, Nakazawa H, Kakizaki I, Sasaki M, et al. A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. *FEBS Lett*. 2005;579(12):2722-6.
  126. Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer. *World J Gastroenterol*. 2013;19(34):5598-606.
  127. Dikken JL, Lemmens VE, Wouters MW, Wijnhoven BP, Siersema PD, Nieuwenhuijzen GA, et al. Increased incidence and survival for oesophageal cancer but not for gastric cardia cancer in the Netherlands. *Eur J Cancer*. 2012;48(11):1624-32.
  128. Otterstatter MC, Brierley JD, De P, Ellison LF, Macintyre M, Marrett LD, et al. Esophageal cancer in Canada: trends according to morphology and anatomical location. *Can J Gastroenterol*. 2012;26(10):723-7.
  129. Stahl M, Mariette C, Haustermans K, Cervantes A, Arnold D. Oesophageal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 6:vi51-6.
  130. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(3):169-81.
  131. Ji H, Li D, Chen L, Shimamura T, Kobayashi S, McNamara K, et al. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer cell*. 2006;9(6):485-95.

## Literaturverzeichnis

132. Khozin S, Blumenthal GM, Jiang X, He K, Boyd K, Murgo A, et al. U.S. Food and Drug Administration approval summary: Erlotinib for the first-line treatment of metastatic non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 19 deletions or exon 21 (L858R) substitution mutations. *Oncologist*. 2014;19(7):774-9.
133. Bendell JC, Meluch A, Peyton J, Rubin M, Waterhouse D, Webb C, et al. A phase II trial of preoperative concurrent chemotherapy/radiation therapy plus bevacizumab/erlotinib in the treatment of localized esophageal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2012;10(7):430-7.
134. Dragovich T, McCoy S, Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Benedetti JK, Baker AF, et al. Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. *J Clin Oncol*. 2006;24(30):4922-7.
135. Li G, Hu W, Wang J, Deng X, Zhang P, Zhang X, et al. Phase II study of concurrent chemoradiation in combination with erlotinib for locally advanced esophageal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;78(5):1407-12.
136. Walsh TN, Noonan N, Hollywood D, Kelly A, Keeling N, Hennessy TP. A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 1996;335(7):462-7.
137. Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, et al. Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol*. 2008;26(7):1086-92.
138. Burmeister BH, Smithers BM, Gebski V, Fitzgerald L, Simes RJ, Devitt P, et al. Surgery alone versus chemoradiotherapy followed by surgery for resectable cancer of the oesophagus: a randomised controlled phase III trial. *Lancet Oncol*. 2005;6(9):659-68.
139. Bedenne L, Michel P, Bouche O, Milan C, Mariette C, Conroy T, et al. Chemoradiation followed by surgery compared with chemoradiation alone in squamous cancer of the esophagus: FFCD 9102. *J Clin Oncol*. 2007;25(10):1160-8.
140. Crehange G, Maingon P, Peignaux K, N'Guyen T D, Mirabel X, Marchal C, et al. Phase III trial of protracted compared with split-course chemoradiation for esophageal carcinoma: Federation Francophone de Cancerologie Digestive 9102. *J Clin Oncol*. 2007;25(31):4895-901.
141. Conroy T, Galais MP, Raoul JL, Bouche O, Gourgou-Bourgade S, Douillard JY, et al. Definitive chemoradiotherapy with FOLFOX versus fluorouracil and cisplatin in patients with oesophageal cancer (PRODIGE5/ACCORD17): final results of a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(3):305-14.
142. Cunningham D, Okines AF, Ashley S. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med*. 2010;362(9):858-9.

## Literaturverzeichnis

143. Liu QW, Fu JH, Luo KJ, Yang HX, Wang JY, Hu Y, et al. Identification of EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*. 2011.
144. Kwak EL, Jankowski J, Thayer SP, Lauwers GY, Brannigan BW, Harris PL, et al. Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations in esophageal and pancreatic adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2006;12(14 Pt 1):4283-7.
145. Gonzaga IM, Soares-Lima SC, de Santos PT, Blanco TC, de Reis BS, Quintella DC, et al. Alterations in epidermal growth factor receptors 1 and 2 in esophageal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer*. 2012;12:569.
146. Wainberg ZA, Lin LS, DiCarlo B, Dao KM, Patel R, Park DJ, et al. Phase II trial of modified FOLFOX6 and erlotinib in patients with metastatic or advanced adenocarcinoma of the oesophagus and gastro-oesophageal junction. *Br J Cancer*. 2011;105(6):760-5.
147. Kato H, Arai T, Matsumoto K, Fujita Y, Kimura H, Hayashi H, et al. Gene amplification of EGFR, HER2, FGFR2 and MET in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2013;42(4):1151-8.
148. Iyer R, Chhatrala R, Shefter T, Yang G, Malhotra U, Tan W, et al. Erlotinib and radiation therapy for elderly patients with esophageal cancer - clinical and correlative results from a prospective multicenter phase 2 trial. *Oncology*. 2013;85(1):53-8.
149. Ilson DH, Kelsen D, Shah M, Schwartz G, Levine DA, Boyd J, et al. A phase 2 trial of erlotinib in patients with previously treated squamous cell and adenocarcinoma of the esophagus. *Cancer*. 2011;117(7):1409-14.
150. Zhai Y, Hui Z, Wang J, Zou S, Liang J, Wang X, et al. Concurrent erlotinib and radiotherapy for chemoradiotherapy-intolerant esophageal squamous cell carcinoma patients: results of a pilot study. *Dis Esophagus*. 2013;26(5):503-9.
151. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc*. 2009;4(3):309-24.
152. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):621-81.
153. Chou TC, Martin N. *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values*. Paramus, NJ: ComboSyn Inc; 2005.
154. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991;139(2):271-9.

## Literaturverzeichnis

155. Rilla K, Tiihonen R, Kultti A, Tammi M, Tammi R. Pericellular hyaluronan coat visualized in live cells with a fluorescent probe is scaffolded by plasma membrane protrusions. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(10):901-10.
156. Yeung T, Terebiznik M, Yu L, Silvius J, Abidi WM, Philips M, et al. Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis. *Science.* 2006;313(5785):347-51.
157. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-82.
158. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
159. Richter G. *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003.
160. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
161. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
162. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):e115.
163. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics.* 2012;13:134.
164. Rogojina AT, Orr WE, Song BK, Geisert EE, Jr. Comparing the use of Affymetrix to spotted oligonucleotide microarrays using two retinal pigment epithelium cell lines. *Mol Vis.* 2003;9:482-96.
165. Twarock S, Röck K, Sarbia M, Weber AA, Janicke RU, Fischer JW. Synthesis of hyaluronan in oesophageal cancer cells is uncoupled from the prostaglandin-cAMP pathway. *Br J Pharmacol.* 2009;157(2):234-43.
166. Röck K, Meusch M, Fuchs N, Tigges J, Zipper P, Fritsche E, et al. Estradiol protects dermal hyaluronan/versican matrix during photoaging by release of epidermal growth factor from keratinocytes. *J Biol Chem.* 2012;287(24):20056-69.
167. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.

## Literaturverzeichnis

168. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 2010;50(4):227-30.
169. Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Wnt signaling from membrane to nucleus: beta-catenin caught in a loop. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(6):847-50.
170. Maeda-Sano K, Gotoh M, Morohoshi T, Someya T, Murofushi H, Murakami-Murofushi K. Cyclic phosphatidic acid and lysophosphatidic acid induce hyaluronic acid synthesis via CREB transcription factor regulation in human skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(9):1256-63.
171. Röck K, Grandoch M, Majora M, Krutmann J, Fischer JW. Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to ultraviolet B (UVB): new insights into mechanisms of matrix remodeling. *J Biol Chem*. 2011;286(20):18268-76.
172. Willenberg A, Saalbach A, Simon JC, Anderegg U. Melanoma cells control HA synthesis in peritumoral fibroblasts via PDGF-AA and PDGF-CC: impact on melanoma cell proliferation. *J Invest Dermatol*. 2012;132(2):385-93.
173. Marieb EA, Zoltan-Jones A, Li R, Misra S, Ghatak S, Cao J, et al. Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production. *Cancer Res*. 2004;64(4):1229-32.
174. Ichikawa T, Itano N, Sawai T, Kimata K, Koganehira Y, Saida T, et al. Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 1999;113(6):935-9.
175. Soon PS, Kim E, Pon CK, Gill AJ, Moore K, Spillane AJ, et al. Breast cancer-associated fibroblasts induce epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(1):1-12.
176. Kim SH, Choe C, Shin YS, Jeon MJ, Choi SJ, Lee J, et al. Human lung cancer-associated fibroblasts enhance motility of non-small cell lung cancer cells in co-culture. *Anticancer Res*. 2013;33(5):2001-9.
177. Zhang C, Fu L, Fu J, Hu L, Yang H, Rong TH, et al. Fibroblast growth factor receptor 2-positive fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(12):4017-27.
178. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol*. 2012;10:29.
179. Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, et al. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*. 2006;3(12):995-1000.

## Literaturverzeichnis

180. Costea DE, Hills A, Osman AH, Thurlow J, Kalna G, Huang X, et al. Identification of two distinct carcinoma-associated fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2013;73(13):3888-901.
181. Pasonen-Seppänen S, Takabe P, Edward M, Rauhala L, Rilla K, Tammi M, et al. Melanoma cell-derived factors stimulate hyaluronan synthesis in dermal fibroblasts by upregulating HAS2 through PDGFR-PI3K-AKT and p38 signaling. *Histochem Cell Biol.* 2012;138(6):895-911.
182. Stern R, Shuster S, Neudecker BA, Formby B. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res.* 2002;276(1):24-31.
183. Edward M, Gillan C, Micha D, Tammi RH. Tumour regulation of fibroblast hyaluronan expression: a mechanism to facilitate tumour growth and invasion. *Carcinogenesis.* 2005;26(7):1215-23.
184. Xu J, Lu Y, Qiu S, Chen ZN, Fan Z. A novel role of EMMPRIN/CD147 in transformation of quiescent fibroblasts to cancer-associated fibroblasts by breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2013;335(2):380-6.
185. Edward M, Quinn JA, Sands W. Keratinocytes stimulate fibroblast hyaluronan synthesis through the release of stratifin: a possible role in the suppression of scar tissue formation. *Wound Repair Regen.* 2011;19(3):379-86.
186. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 1996;382(6592):638-42.
187. Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Regulation of beta-catenin nuclear dynamics by GSK-3beta involves a LEF-1 positive feedback loop. *Traffic.* 2011;12(8):983-99.
188. Wan X, Liu J, Lu JF, Tzelepi V, Yang J, Starbuck MW, et al. Activation of beta-catenin signaling in androgen receptor-negative prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2012;18(3):726-36.
189. Carre AL, James AW, MacLeod L, Kong W, Kawai K, Longaker MT, et al. Interaction of wingless protein (Wnt), transforming growth factor-beta1, and hyaluronan production in fetal and postnatal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(1):74-88.
190. Fu L, Zhang C, Zhang LY, Dong SS, Lu LH, Chen J, et al. Wnt2 secreted by tumour fibroblasts promotes tumour progression in oesophageal cancer by activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway. *Gut.* 2011;60(12):1635-43.
191. Roy S, Kornberg TB. Paracrine signaling mediated at cell-cell contacts. *Bioessays.* 2015;37(1):25-33.

## Literaturverzeichnis

192. Lidke DS, Lidke KA, Rieger B, Jovin TM, Arndt-Jovin DJ. Reaching out for signals: filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors. *J Cell Biol.* 2005;170(4):619-26.
193. Port F, Basler K. Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading. *Traffic.* 2010;11(10):1265-71.
194. Apostolopoulou M, Ligon L. Cadherin-23 mediates heterotypic cell-cell adhesion between breast cancer epithelial cells and fibroblasts. *PLoS One.* 2012;7(3):e33289.
195. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* 2001;61(9):3819-25.
196. Tran NL, Nagle RB, Cress AE, Heimark RL. N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion with stromal cells. *Am J Pathol.* 1999;155(3):787-98.
197. Omelchenko T, Fetisova E, Ivanova O, Bonder EM, Feder H, Vasiliev JM, et al. Contact interactions between epitheliocytes and fibroblasts: formation of heterotypic cadherin-containing adhesion sites is accompanied by local cytoskeletal reorganization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(15):8632-7.
198. Yu Y, Xiao CH, Tan LD, Wang QS, Li XQ, Feng YM. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-beta signalling. *Br J Cancer.* 2014;110(3):724-32.
199. Sanchez-Tillo E, de Barrios O, Siles L, Cuatrecasas M, Castells A, Postigo A. beta-catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(48):19204-9.
200. Gao MQ, Kim BG, Kang S, Choi YP, Park H, Kang KS, et al. Stromal fibroblasts from the interface zone of human breast carcinomas induce an epithelial-mesenchymal transition-like state in breast cancer cells in vitro. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 20):3507-14.
201. Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, et al. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res.* 2010;70(17):6945-56.
202. Berdiel-Acer M, Bohem ME, Lopez-Doriga A, Vidal A, Salazar R, Martinez-Iniesta M, et al. Hepatic carcinoma-associated fibroblasts promote an adaptative response in colorectal cancer cells that inhibit proliferation and apoptosis: nonresistant cells die by nonapoptotic cell death. *Neoplasia.* 2011;13(10):931-46.
203. Xuan X, Zeng Q, Li Y, Gao Y, Wang F, Zhang H, et al. Akt-mediated transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in

## Literaturverzeichnis

- cultured human esophageal squamous cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 2014;21(6):238-45.
204. Liu J, Chen L, Deng H, Xu B, Li M, Zheng X, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in human esophageal cancer associates with tumor progression and patient's survival. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(10):6943-9.
205. Nakashima Y, Yoshinaga K, Kitao H, Ando K, Kimura Y, Saeki H, et al. Podoplanin is expressed at the invasive front of esophageal squamous cell carcinomas and is involved in collective cell invasion. *Cancer Sci.* 2013;104(12):1718-25.
206. Niedworok C, Kretschmer I, Röck K, Vom Dorp F, Szarvas T, Hess J, et al. The impact of the receptor of hyaluronan-mediated motility (RHAMM) on human urothelial transitional cell cancer of the bladder. *PLoS One.* 2013;8(9):e75681.
207. Meyer-Siegler KL, Leifheit EC, Vera PL. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells. *BMC Cancer.* 2004;4:34.
208. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 2005;121(3):335-48.
209. Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Chen YW. CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J Biol Chem.* 2000;275(3):1829-38.
210. Cordo-Russo RI, Alaniz LD, Saccodossi N, Lompardia S, Blanco G, Alvarez E, et al. Hyaluronan induces migration of multidrug-resistant lymphoma cell lines in vitro through Tiam1 activation by a PI3K-dependent mechanism. *Leuk Res.* 2010;34(11):1525-32.
211. Berdiel-Acer M, Sanz-Pamplona R, Calon A, Cuadras D, Berenguer A, Sanjuan X, et al. Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information. *Mol Oncol.* 2014;8(7):1290-305.
212. Saito S, Morishima K, Ui T, Matsubara D, Tamura T, Oguni S, et al. Stromal fibroblasts are predictors of disease-related mortality in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2014;32(1):348-54.
213. Grugan KD, Miller CG, Yao Y, Michaylira CZ, Ohashi S, Klein-Szanto AJ, et al. Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(24):11026-31.

## Literaturverzeichnis

214. Tolg C, Telmer P, Turley E. Specific sizes of hyaluronan oligosaccharides stimulate fibroblast migration and excisional wound repair. *PLoS One*. 2014;9(2):e88479.
215. Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M. Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem*. 2003;278(34):32259-65.
216. Noma K, Smalley KS, Lioni M, Naomoto Y, Tanaka N, El-Deiry W, et al. The essential role of fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma-induced angiogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(7):1981-93.
217. Webber J, Jenkins RH, Meran S, Phillips A, Steadman R. Modulation of TGFbeta1-dependent myofibroblast differentiation by hyaluronan. *Am J Pathol*. 2009;175(1):148-60.
218. Midgley AC, Rogers M, Hallett MB, Clayton A, Bowen T, Phillips AO, et al. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. *J Biol Chem*. 2013;288(21):14824-38.
219. Simpson RM, Wells A, Thomas D, Stephens P, Steadman R, Phillips A. Aging fibroblasts resist phenotypic maturation because of impaired hyaluronan-dependent CD44/epidermal growth factor receptor signaling. *Am J Pathol*. 2010;176(3):1215-28.
220. Vicent S, Sayles LC, Vaka D, Khatri P, Gevaert O, Chen R, et al. Cross-species functional analysis of cancer-associated fibroblasts identifies a critical role for CLCF1 and IL-6 in non-small cell lung cancer in vivo. *Cancer Res*. 2012;72(22):5744-56.
221. Aldinucci D, Colombatti A. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:292376.
222. Mitra AK, Zillhardt M, Hua Y, Tiwari P, Murmann AE, Peter ME, et al. MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer. *Cancer Discov*. 2012;2(12):1100-8.
223. Nazareth MR, Broderick L, Simpson-Abelson MR, Kelleher RJ, Jr., Yokota SJ, Bankert RB. Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells. *J Immunol*. 2007;178(9):5552-62.
224. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, Takashi S, et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer cell*. 2011;19(2):257-72.

## Literaturverzeichnis

225. Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature*. 2011;470(7335):548-53.
226. Mi Z, Bhattacharya SD, Kim VM, Guo H, Talbot LJ, Kuo PC. Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis. *Carcinogenesis*. 2011;32(4):477-87.
227. Shevde LA, Samant RS. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol*. 2014;37:131-41.
228. Müller J. Untersuchung der Effekte von Interleukin-6 auf den Umbau der kardialen extrazellulären Matrix nach akutem Myokardinfarkt [Dissertation]: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2014.
229. Suga H, Sugaya M, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, et al. TLR4, rather than TLR2, regulates wound healing through TGF-beta and CCL5 expression. *J Dermatol Sci*. 2014;73(2):117-24.
230. Jang S, Park JS, Won YH, Yun SJ, Kim SJ. The Expression of Toll-Like Receptors (TLRs) in Cultured Human Skin Fibroblast is Modulated by Histamine. *Chonnam Med J*. 2012;48(1):7-14.
231. Müller J, Gorressen S, Grandoch M, Feldmann K, Kretschmer I, Lehr S, et al. Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2014;109(6):440.
232. Roscic-Mrkic B, Fischer M, Leemann C, Manrique A, Gordon CJ, Moore JP, et al. RANTES (CCL5) uses the proteoglycan CD44 as an auxiliary receptor to mediate cellular activation signals and HIV-1 enhancement. *Blood*. 2003;102(4):1169-77.
233. Fuchs K, Hippe A, Schmaus A, Homey B, Sleeman JP, Orian-Rousseau V. Opposing effects of high- and low-molecular weight hyaluronan on CXCL12-induced CXCR4 signaling depend on CD44. *Cell Death Dis*. 2013;4:e819.
234. Su X, Ye J, Hsueh EC, Zhang Y, Hoft DF, Peng G. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunol*. 2010;184(3):1630-41.
235. Jameson JM, Cauvi G, Sharp LL, Witherden DA, Havran WL. Gammadelta T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(8):1269-79.
236. Tiainen S, Tumelius R, Rilla K, Hamalainen K, Tammi M, Tammi R, et al. High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology*. 2014.
237. Alaniz L, Rizzo M, Malvicini M, Jaunarena J, Avella D, Atorrasagasti C, et al. Low molecular weight hyaluronan inhibits colorectal carcinoma growth by

## Literaturverzeichnis

- decreasing tumor cell proliferation and stimulating immune response. *Cancer Lett.* 2009;278(1):9-16.
238. Bollyky PL, Falk BA, Long SA, Preisinger A, Braun KR, Wu RP, et al. CD44 costimulation promotes FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *J Immunol.* 2009;183(4):2232-41.
239. Bollyky PL, Lord JD, Masewicz SA, Evanko SP, Buckner JH, Wight TN, et al. Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol.* 2007;179(2):744-7.
240. Chang LY, Lin YC, Mahalingam J, Huang CT, Chen TW, Kang CW, et al. Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF-beta-mediated killing of CD8(+) T cells in colon cancer by T-regulatory cells. *Cancer Res.* 2012;72(5):1092-102.
241. Sugasawa H, Ichikura T, Kinoshita M, Ono S, Majima T, Tsujimoto H, et al. Gastric cancer cells exploit CD4<sup>+</sup> cell-derived CCL5 for their growth and prevention of CD8<sup>+</sup> cell-involved tumor elimination. *Int J Cancer.* 2008;122(11):2535-41.
242. Jayasinghe MM, Golden JM, Nair P, O'Donnell CM, Werner MT, Kurt RA. Tumor-derived CCL5 does not contribute to breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;111(3):511-21.
243. Zhang Y, Lv D, Kim HJ, Kurt RA, Bu W, Li Y, et al. A novel role of hematopoietic CCL5 in promoting triple-negative mammary tumor progression by regulating generation of myeloid-derived suppressor cells. *Cell research.* 2013;23(3):394-408.
244. Slettenaar VI, Wilson JL. The chemokine network: a target in cancer biology? *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(8):962-74.
245. Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Emmerich F, Muller G, Foss HD, et al. Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood.* 1999;94(6):2065-71.
246. Agarwal M, He C, Siddiqui J, Wei JT, Macoska JA. CCL11 (eotaxin-1): a new diagnostic serum marker for prostate cancer. *Prostate.* 2013;73(6):573-81.
247. Levina V, Nolen BM, Marrangoni AM, Cheng P, Marks JR, Szczepanski MJ, et al. Role of eotaxin-1 signaling in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(8):2647-56.
248. Koc U, Cetinkaya E, Bostanci EB, Kemik AS, Tez M, Gomceli I, et al. Diagnostic significance of serum eotaxin-1 level in gastric cancer patients. *Dis Markers.* 2013;35(5):363-7.
249. Menzies-Gow A, Ying S, Sabroe I, Stubbs VL, Soler D, Williams TJ, et al. Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils,

## Literaturverzeichnis

- basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers. *J Immunol.* 2002;169(5):2712-8.
250. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science.* 1997;277(5334):2005-7.
251. Salcedo R, Young HA, Ponce ML, Ward JM, Kleinman HK, Murphy WJ, et al. Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. *J Immunol.* 2001;166(12):7571-8.
252. Simson L, Ellyard JI, Dent LA, Matthaei KI, Rothenberg ME, Foster PS, et al. Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J Immunol.* 2007;178(7):4222-9.
253. Kataoka S, Konishi Y, Nishio Y, Fujikawa-Adachi K, Tominaga A. Antitumor activity of eosinophils activated by IL-5 and eotaxin against hepatocellular carcinoma. *DNA Cell Biol.* 2004;23(9):549-60.
254. Mattes J, Hulett M, Xie W, Hogan S, Rothenberg ME, Foster P, et al. Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med.* 2003;197(3):387-93.
255. Puxeddu I, Bader R, Piliponsky AM, Reich R, Levi-Schaffer F, Berkman N. The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(1):103-10.
256. Küntzer J, Maisel D, Lenhof HP, Klostermann S, Burtscher H. The Roche Cancer Genome Database 2.0. *BMC Med Genomics.* 2011;4:43.
257. Fichter CD, Timme S, Braun JA, Gudernatsch V, Schöpflin A, Bogatyreva L, et al. EGFR, HER2 and HER3 dimerization patterns guide targeted inhibition in two histotypes of esophageal cancer. *Int J Cancer.* 2014;135(7):1517-30.
258. Fichter CD, Gudernatsch V, Przepadlo CM, Follo M, Schmidt G, Werner M, et al. ErbB targeting inhibitors repress cell migration of esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cells by distinct signaling pathways. *Journal of molecular medicine.* 2014.
259. Sutter AP, Höpfner M, Huether A, Maaser K, Scherubl H. Targeting the epidermal growth factor receptor by erlotinib (Tarceva) for the treatment of esophageal cancer. *Int J Cancer.* 2006;118(7):1814-22.
260. Kultti A, Pasonen-Seppänen S, Jauhiainen M, Rilla KJ, Kärnä R, Pyoria E, et al. 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. *Exp Cell Res.* 2009;315(11):1914-23.
261. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(7):528-39.

## Literaturverzeichnis

262. Wang SJ, Bourguignon LY. Hyaluronan and the interaction between CD44 and epidermal growth factor receptor in oncogenic signaling and chemotherapy resistance in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132(7):771-8.
263. Perez A, Neskey DM, Wen J, Pereira L, Reategui EP, Goodwin WJ, et al. CD44 interacts with EGFR and promotes head and neck squamous cell carcinoma initiation and progression. *Oral Oncol.* 2013;49(4):306-13.
264. Toole BP. Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin Cancer Res.* 2009;15(24):7462-8.
265. Tsatas D, Kanagasundaram V, Kaye A, Novak U. EGF receptor modifies cellular responses to hyaluronan in glioblastoma cell lines. *J Clin Neurosci.* 2002;9(3):282-8.
266. Dobelbower MC, Russo SM, Raisch KP, Seay LL, Clemons LK, Suter S, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib, and concurrent 5-fluorouracil, cisplatin and radiotherapy for patients with esophageal cancer: a phase I study. *Anti-cancer drugs.* 2006;17(1):95-102.

## **Appendix**

## Appendix

**Tabelle 3. Hyaluronsäuresynthase-Isoformen, -Transkriptionvarianten und antisense-RNA**

Name ENSEMBL	ENSEMBL-ID	Name NCBI	NCBI-ID	Proteinlänge
HAS1-001*	ENST00000540069	<i>HAS1 transcript variant 2, isoform 2</i>	NM_001297436	577 aa
HAS1-005	ENST00000222115	<i>HAS1 transcript variant 1, isoform 1</i>	NM_001523	578 aa
HAS1-002	ENST00000601714			585 aa
HAS1-003	ENST00000594621			214 aa
HAS1-004	ENST00000601667			140 aa
Has1-201	ENSMUST00000003762	Has1	NM_008215	583 aa
	/	<i>uncharacterized LOC102640970 (LOC102640970), transcript variant X2, ncRNA</i>	XR_385438	/
HAS2-001*	ENST00000303924	HAS2	NM_005328	552 aa
HAS2-AS1-001	ENST00000514180	<i>HAS2 antisense RNA 1 (HAS2-AS1)</i>	NR_002835	<i>antisense</i>
HAS2-AS1-004	ENST00000522197			<i>antisense</i>
HAS2-AS1-002	ENST00000518865			<i>antisense</i>
HAS2-AS1-003	ENST00000520043			<i>antisense</i>
Has2-001*	ENSMUST00000050544	Has2	NM_008216	552 aa
Has2os-003	ENSMUST00000166290			
Has2os-002	ENSMUST00000163314			
Has2os-001	ENSMUST00000125401	<i>HAS2, opposite strand (Has2os), long non-coding RNA</i>	NR_002874	/
Has2os-004	ENSMUST00000165880			
HAS3-003*	ENST00000569188	<i>HAS3, transcript variant 3, isoform a</i>	NM_001199280	553 aa
HAS3-001*	ENST00000306560	<i>HAS3, transcript variant 1, isoform a</i>	NM_005329	553 aa
HAS3-002*	ENST00000219322	<i>HAS3, transcript variant 2, isoform b</i>	NM_138612	281 aa
HAS3-004	ENST00000566118			264 aa
HAS3-005	ENST00000568321			/
	/	<i>predicted HAS3, transcript variant X2</i>	XM_005255920	553 aa
	/	<i>predicted HAS3, transcript variant X3</i>	XM_005255921	553 aa
Has3-001*	ENSMUST00000034385	Has3	NM_008217	554 aa
Has3-002	ENSMUST00000176144			554 aa
Has3-003	ENSMUST00000175987			258 aa
	/	<i>predicted Has3, transcript variant X3</i>	XM_006530701	554 aa
	/	<i>predicted Has3, transcript variant X1</i>	XM_006530699	554 aa
	/	<i>predicted Has3, transcript variant X2</i>	XM_006530700	554 aa

\* Transkript identisch bei der automatischen Annotation von Ensembl und der manuellen von VEGA/Havana und kann daher als stabil betrachtet werden.

aa: Aminosäuren

Die Tabelle basiert auf Angaben der Datenbanken Ensembl [97] und NCBI Gene Database [94]. Humane Gene sind mit weißem Hintergrund unterlegt, murine mit grauem.

## Appendix

**Tabelle 4. Erlotinib in der Therapie des Ösophaguskarzinoms.**

Artikel (Autor, Jahr)	Studien-typ	Pat. Zahl	Patienten- merkmale	Intervention	Ergebnis	Unerwünschte Ereignisse	EGFR Status
Bendell, 2012 [133]	Phase II, unverblindet, multizentrisch	62	58 EAC 4 ESCC Ohne Vorbehandlung	Erlotinib 100 mg/Tag Paclitaxel (200 mg/m <sup>2</sup> ), Carboplatin (AUC 5,0) Bevacizumab (15 mg/kg) 5-FU (225 mg/m <sup>2</sup> ) Radiotherapie 45 Gy	CR: 18/62 PR: 22/62 OS: 30,2 m PFS: 28,6 m	>Grad 2 40 Leukozytopenie 27 Neutropenie 26 Mucositis/Stomatitis 19 Dehydratation 17 Diarrhoe 17 Esophagitis 10 Anorexie 9 Fatigue 9 Rash 7 fiebrige Neutropenie 5 Thrombozytopenie 4 Anämie 4 Nausea/Erbrechen 4 Thrombus/Embolie 3 GI Blutungen 2 Wundkomplikation 1 Periphere arterielle Ischämie 1 Synkope 1 Abdominale Eviszeration	%
Dobelbower, 2006 [266]	Phase I	11	8 EAC 3 ESCC	Erlotinib 50, 100, 150 mg/Tag Radiotherapie: 50,4 Gy Cisplatin (75 mg/m <sup>2</sup> ) 5-FU (1000 mg/m <sup>2</sup> /24 h)	%	11 Esophagitis 10 Anämie 9 Leukozytopenie 9 Nausea 9 Fatigue 7 Thrombozytopenie 7 Gewichtsverlust 6 Rash 4 Erbrechen 4 Diarrhoe 3 Dehydratation	%
Dragovich, 2006 [134]	Phase II unverblindet, multizentrisch	43	43 EAC	Erlotinib 150 mg/Tag	CR: 1/43 PR: 3/43 SD: 5/43 OS: 6,7 m TTF 2 m	37 Rash 25 Diarrhoe 22 Fatigue 10 Erbrechen 9 Pruritus	86% EGFR positive 0 EGFR Mutationen in Exons 18,19,21 0 EGFR Amplifikationen

## Appendix

Artikel (Autor, Jahr)	Studien-typ	Pat. Zahl	Patienten-merkmale	Intervention	Ergebnis	Unerwünschte Ereignisse	EGFR Status
Ilson, 2011 [149]	Phase II, unizentrisch	30	17 EAC 13 ESCC	Erlotinib 150 mg/Tag	CR: 2/30 total 2/13 ESCC 0/17 EAC SD: 15/30 7/13 ESCC 8/17 EAC TTP: 3,3 m ESCC 1,6 m EAC OS: 10,3 m total 8,2 m ESCC 11,2m EAC	23 Rash 4 Diarrhoe	24/30 OE EGFR 12/17 EAC OE EGFR 12/13 ESCC OE EGFR Keine signifikante Korrelation von der Höhe der EGFR Expression und Ansprechen der Therapie 0/5 EGFR Mutationen in Exons 18,19,21
Iyer, 2013 [148]	Phase II unverblindet, multizentrisch	17	16 EAC 1 ESCC Ohne Vorbehandlung > 65 Jahre Platinbasierte Therapie möglich nicht	Erlotinib 150 mg/Tag, Radiotherapie 50,4 Gy	CR: 2/9 PR: 3/9 OS: 7,3 m geschätze PFS: 4,5 m 1-Jahres Überlebensrate: 29%	16 Fatigue 13 Rash 11 Diarrhoe 10 Lymphopenie 7 Anorexie 6 Dehydratation n<5 Andere	4 EGFR Amplifikationen 12 EGFR negativ/ niedrige Kopienzahl PFS/OS von Patienten mit EGFR Amplifikation: 22,3 m (beides) PFS/OS von Patienten ohne Amplifikation: 4,2 m / 6,4 m Der Unterschied ist nicht signifikant.
Li, 2010 [135]	Phase II	24	24 ESCC	Erlotinib 150 mg/Tag Paclitaxel 135 mg/m <sup>2</sup> Cisplatin 20 mg/m <sup>2</sup> Radiotherapie 60 Gy	CR: 11/24 PR: 11/24 2-Jahres Überlebensrate: 70,1%	24 Leukozytopenie 24 Erbrechen 24 Esophagitis 21 Alopezie 21 Rash 13 Tracheitis 8 Anämie 7 Thrombozytopenie	%

## Appendix

Artikel (Autor, Jahr)	Studien-typ	Pat. Zahl	Patienten-merkmale	Intervention	Ergebnis	Unerwünschte Ereignisse	EGFR Status
Wainberg, 2011 [146]	Phase II unverblindet, multizentrisch	38	38 EAC	Erlotinib 150 mg/Tag Oxaliplatin 85 mg/m <sup>2</sup> , 5-FU 400 mg/m <sup>2</sup> bzw. 2400mg/m <sup>2</sup> , Leucovorin 400 mg/m <sup>2</sup>	CR: 2/33 PR: 15/33 SD: 11/33 OS: 11 m PFS: 5,5 m	>Grad 2 9 Diarrhoe 5 Anorexie 5 Neutropenie 4 Nausea/Erbrechen 4 Fatigue 3 Rash 3 Periphere Neuropathie 1 fiebrige Neutropenie	0/36 EGFR Mutationen 3/36 EGFR Amplifikation EGFR Status hat keinen Vorhersagewert von PFS oder OS.
Zhai Y, 2012, [150]	Phase II	18	18 ESCC	Erlotinib 150 mg/Tag Radiotherapie 60 Gy	CR: 2/18 PR: 11/18 SD: 5/18 Median OS: 21,1 m PFS: 12 m 2-Jahres Überlebensrate 44,4%	>Grad 2 5 Esophagitis 2 Rash	5/6 hohe EGFR Expression Zu wenige Patienten, um EGFR mit Behandlungsergebnissen zu korrelieren.

EAC: Adenokarzinom des Oesophagus, inkl. Oesophagogastraler Übergang

ESCC: Plattenepithelkarzinom des Oesophagus

5-FU: 5-Fluorouracil

CR: vollständiges Ansprechen (*complete response*)

OE: Überexpression (*overexpression*)

OS: Gesamtüberleben (*overall survival*)

PFS: Progressionsfreies Überleben (*progression free survival*)

PR: partielles Ansprechen (*partial response*)

SD: stabile Erkrankung (*stable disease*)

## Appendix

**Tabelle 5. Zusammensetzung der Nährmedien in der Zellkultur.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Fibroblasten-Medium</b>	1% Penicillin-Streptomycin (P/S) (10 000 U/ml) 1% MEM <i>Non-Essential Amino Acids Solution</i> 20% FCS In <i>DMEM high glucose</i> alles von Gibco®, Life Technologies™, Paisley, UK
<b>Tumorzell-Medium</b>	1%P/S 10% FCS In <i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 RPMI GLUTAMAX I Medium</i> alles von Gibco® Life Technologies™

## Appendix

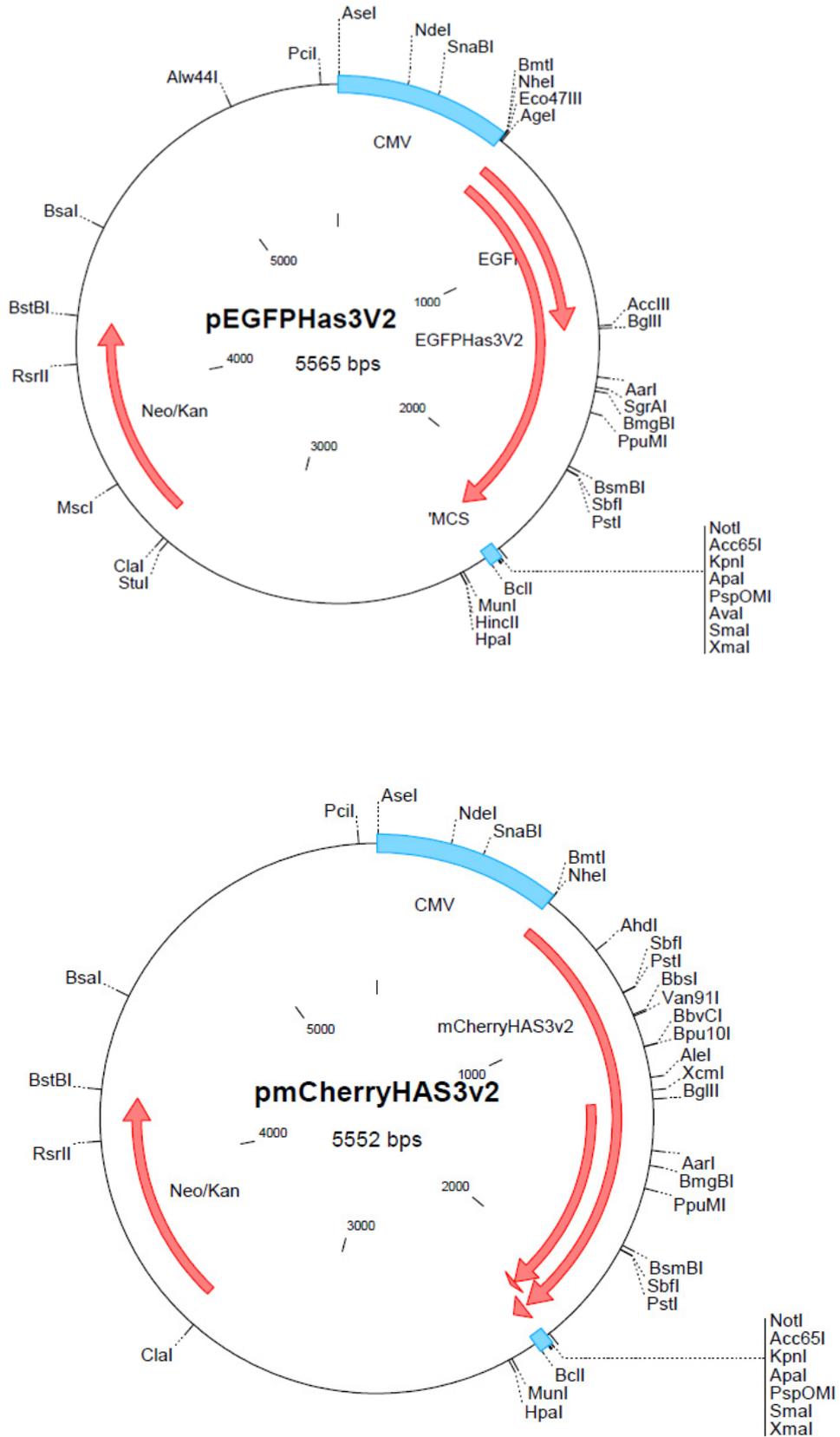


Abbildung 33. Plasmide codierend für EGFP- und mCherry- HAS3b-Fusionsproteine.

## Appendix

**Tabelle 6. Verwendete si RNA.**

Bezeichnung	Ziel-mRNA (RefSeq NCBI)	Bestellnr. (Qiagen, Hilden)
Mm_Bsg_3 FlexiTube siRNA	NM_001077184, NM_009768	SI00187376
Mm_Lef1_5 FlexiTube siRNA	NM_010703, NM_001276402, NM_001276403	SI02713025
Hs_BSG_1 FlexiTube siRNA	NM_001728, NM_198589, NM_198590, NM_198591	SI00313733
Hs_CD44_5 FlexiTube siRNA	NM_000610, NM_001001389, NM_001001390, NM_001001391, NM_001202555, NM_001202556, NM_001202557	SI00299705
Hs_HAS2_4 FlexiTube siRNA	NM_005328, XM_001128807	SI00075831
Hs_HAS3_2 FlexiTube siRNA	NM_001199280, NM_005329, NM_138612	SI00433895
Hs_HMMR_5 FlexiTube siRNA	NM_001142556, NM_001142557, NM_012484, NM_012485	SI02653196
<i>AllStars</i> <i>Negative control</i> <i>siRNA</i>	/	SI03650318

## Appendix

**Tabelle 7. Zusammensetzung der Gele für die Western-Blot-Analyse.**

Sammelgel	Für 4 Gele (ml)	Trenngel	Für 4 8% Gele (ml)	Für 4 10% Gele (ml)	Für 4 12% Gele (ml)
Wasser	13	Wasser	15,9	14,4	13
Rotiphorese® Gel 40	2,25	Rotiphorese® Gel 40	6	7,5	11
1.0 M Tris pH = 6.8	2,25	1.5 M Tris pH = 8.8	7,5	7,5	7,5
10 % SDS	0,18	10 % SDS	0,3	0,3	0,3
Temed	0,02	Temed	0,03	0,03	0,03
10 % APS	0,18	10 % APS	0,3	0,3	0,3

Rotiphorese® Gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 40% Acrylamid-, Bisacrylamid-Gel 40 Stammlösung im Verhältnis 37,5:1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Sigma Aldrich, St. Louis

APS Ammonium peroxodisulfat, Sigma Aldrich, St. Louis

SDS Natriumdodecylsulfat/ Natriumlaurylsulfat, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tris 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, Trizma® base, Sigma Aldrich, St. Louis

**Tabelle 8. Zusammensetzung der Lysepuffer.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>zweifach Lysepuffer</b>	125 mM Tris 20% Glycerol 4% SDS 100 mM Dithiothreitol 100 mM Natriumfluorid, 1µg/ml Leupeptin, 1µg/ml Aprotinin Bromphenol-Blau pH = 6,8
<b>Triton X-100 Lysepuffer</b>	137,5 mM NaCl 50 mM Tris 10% Glycerol 0.5% Triton X-100 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 50 mM NaF 5 mM EDTA Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma Aldrich) pH= 7,5

## Appendix

**Tabelle 9. Primärantikörper.**

Bezeichnung	Bestellnr.	Firma	Anwendung
AKT Antikörper (Kaninchen)	9272	Cell signaling Technology®	WB
Phospho-AKT Antikörper (Kaninchen)	9271	Cell signaling Technology®	WB
αSMA Antikörper (Kaninchen)	ab5694	Abcam®	WB, ICC, IHC
β-Catenin (6B3) Antikörper (Kaninchen)	9582	Cell signaling Technology®	ICC
β-Tubulin I Antikörper (Maus)	T7816	Sigma-Aldrich	WB
DDK, OctA (D-8) Antikörper (Ziege)	sc-807G	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	IP, WB
EYFP, <i>Living Colors</i> ® A.v. (JL-8) Antikörper (Maus)	632381	Clontech Laboratories, Inc.	WB
Hämagglutinin (12CA5) Antikörper (Maus)	1583816	Roche Diagnostics Corporation	WB
HAS3b (HAS3V2B) Antikörper (Kaninchen)	SQ10AK057/8	Squarix GmbH	WB
Keratin K18 (CK-18) Antikörper (Meerschweinchen)	GP-CK18	Progen Biotechnik GmbH	ICC, IHC
p44/42 MAPK (ERK1/2) Antikörper (Kaninchen)	9102	Cell signaling Technology®	WB
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) Antikörper (Kaninchen)	9101	Cell signaling Technology®	WB
PARP Antikörper (Kaninchen)	9542	Cell signaling Technology®	WB

**Tabelle 10. Sekundärantikörper.**

Bezeichnung	Bestellnr.	Firma	Anwendung
<i>Anti-Mouse IRDye</i> ® 680LT (Ziege)	926-32210	LI-COR® Biosciences	WB
<i>Anti-Mouse IRDye</i> ® 800CW (Ziege)	926-68020	LI-COR® Biosciences	WB
<i>Anti-Rabbit IRDye</i> ® 680RD (Ziege)	926-68071	LI-COR® Biosciences	WB
<i>Anti-Rabbit IRDye</i> ® 800CW (Ziege)	926-32211	LI-COR® Biosciences	WB
Alexa Fluor 568 Anti-Kaninchen (Ziege)	A-11036	Life Technologies™	ICC, IHC
FITC Anti-Meerschweinchen Antikörper (Ziege)	106-096-003	Dianova	ICC, IHC

## Appendix

**Tabelle 11. Pufferzusammensetzung.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl 2,7mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7,8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O pH=7,4
TBS	10 mM Tris 150 mM NaCl pH=7,6
TBS/T	10 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % Tween® 20 pH=7,6

**Tabelle 12. Primersequenzen für speziesspezifische qPCR muriner Gene.**

Zielgen	Vorwärtsprimer (5' – 3')	Rückwärtsprimer (5' – 3')
<i>Bsg</i>	GTGGGCAGAAGCGAGATCAA	AGGGTAGGATGCATCGGACT
<i>Ccl5</i>	AGCAGCAAGTGCTCCAATCT	CCCACCTTCTTCTCTGGGTTG
<i>Ccl11</i>	CACGGTCACTTCCTTCACCT	GCTTTCAGGGTGCATCTGTT
<i>Gapdh</i>	GGTGCTGAGTATGTCGTGGA	GTGGTTCACACCCATCACAA
<i>Has1</i>	TATGCTACCAAGTATACCTCG	TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC
<i>Has2</i>	CGGAGGACGAGTCTATGAGC	TGTGATTCCGAGGAGGAGAG
<i>Has3</i>	TCCCCAAGTAGGAGGTGTTG	CTCACACTGCTCAGGAAGGA
<i>Lef1</i>	GCACGGAAAGAGAGACAGCTA	TCTGGGACCTGTACCTGAAGT

## Appendix

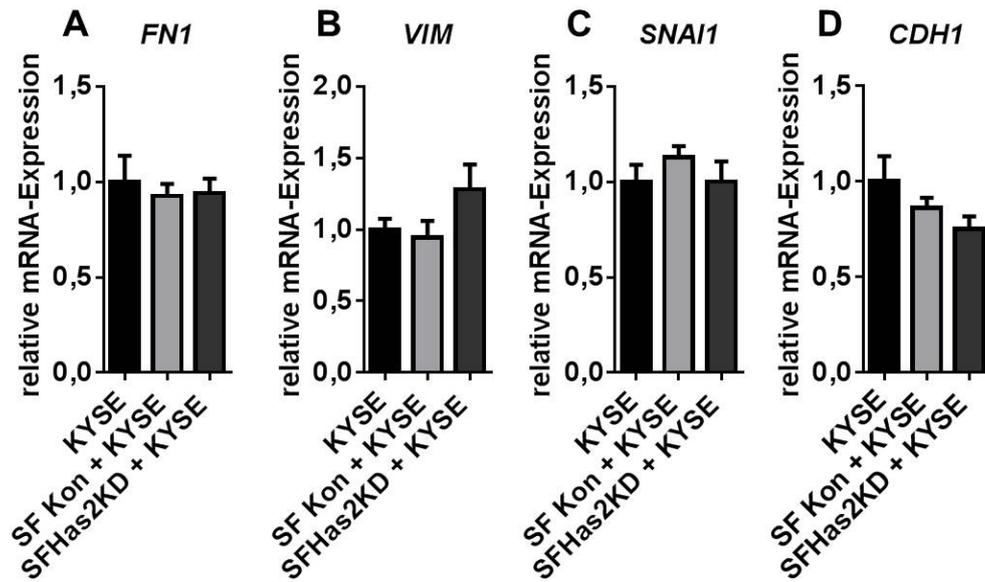
**Tabelle 13. Primersequenzen für speziesspezifische qPCR humaner Gene.**

Zielgen	Vorwärtsprimer (5' – 3')	Rückwärtsprimer (5' – 3')
<i>BSG</i>	TCTGCAAGTCAGAGTCCGTG	TCACGAAGAACCTGCTCTCG
<i>CCR1</i>	CACGGACAAAGTCCCTTGGA	TCAAACCTCTGTGGTCGTGTCA
<i>CCR3</i>	ACCACTGGTCTTCTTGTGCTT	TGTGGTACCAAAGGTCTCAACT
<i>CCR5</i>	GACATCCGTTCCCCTACAAGA	TGGCAGGGCTCCGATGTAT
<i>CDH1</i>	GCCGAGAGCTACACGTTCA	ACACCATCTGTGCCCACTTT
<i>FN1</i>	GCTGGGCGAGGGAGAATAAG	TGGTCTCCTCCAGGTGTCAC
<i>GAPDH</i>	CGAGATCCCTCCAAAATCAA	GGCAGAGATGATGACCCTTT
<i>HAS1</i>	TCGGAGATTCGGTGGACTAC	GTCCAGTACCCGCACGAG
<i>HAS2</i>	GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA	TCCAACCATGGGATCTTCTT
<i>HAS3</i>	CGAGATGCTTCGAGTCCTGG	ACGCTGCTCAGGAAGGAAAT
<i>MKI67</i>	CTGCTCGACCCTACAGAGTG	GCGATGTGACATGTGCTTGT
<i>SNAI1</i>	GCGAGCTGCAGGACTCTAAT	GGACAGAGTCCCAGATGAGC
<i>VIM</i>	GCAAAGCAGGAGTCCACTGA	GCAGCTTCAACGGCAAAGTT

**Tabelle 14. Primersequenzen zur Überprüfung des *knockdowns* humaner Gene durch qPCR.**

Zielgen	Vorwärtsprimer (5' – 3')	Rückwärtsprimer (5' – 3')
<i>CD44</i>	GCTATTGAAAGCCTTGCAGAG	CGCAGATCGATTTGAATATAACC
<i>GAPDH</i>	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	TGAGGTCAATGAAGGGGTC
<i>HAS2</i>	GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA	TCCAACCATGGGATCTTCTT
<i>HAS3</i>	GAGATGTCCAGATCCTCAACAA	CCCCTAATACACTGCACAC
<i>RHAMM</i>	GAATTTGAGAATTCTAAGCTTG	CCATCATACCCCTCATCTTTGTT

## Appendix



**Abbildung 34. Untersuchungen zur epithelial-mesenchymalen Transition von KYSE-410-Zellen nach 48-stündiger Ko-Kultur.**

**A-D,** mRNA-Expression der mesenchymalen Marker Fibronectin (*FN1*), Vimentin (*VIM*), *SNAI1* und des epithelialen Markers E-Cadherin (*CDH1*) in KYSE-410-Zellen nach 96-stündiger Mono- und Ko-Kultur. Die Ko-Kultur enthielt Has2-*knockdown* Fibroblasten (SFHas2KD) oder Kontroll-Fibroblasten (SF Kon), n = 4.

## Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

Müller J, Gorressen S, Grandoch M, Feldmann K, **Kretschmer I**, Lehr S, Ding Z, Schmitt JP, Schrader J, Garbers C, Heusch G, Kelm M, Scheller J, Fischer JW. Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2014;109(6):440.

Freudenberger T, Deenen R, **Kretschmer I**, Zimmermann A, Seiler LF, Mayer P, Heim HK, Köhrer K, Fischer JW. Synthetic gestagens exert differential effects on arterial thrombosis and aortic gene expression in ovariectomized apolipoprotein E-deficient mice. *Br J Pharmacol.* 2014;171(22):5032-48.

Niedworok C, Röck K, **Kretschmer I**, Freudenberger T, Nagy N, Szarvas T, Vom Dorp F, Reis H, Rübber H, Fischer JW. Inhibitory role of the small leucine-rich proteoglycan biglycan in bladder cancer. *PLoS One.* 2013;8(11):e80084.

Niedworok C, **Kretschmer I**, Röck K, Vom Dorp F, Szarvas T, Heß J, Freudenberger T, Melchior-Becker A, Rübber H, Fischer JW. The impact of the receptor of hyaluronan-mediated motility (RHAMM) on human urothelial transitional cell cancer of the bladder. *PLoS One.* 2013;8(9):e75681.

**Kretschmer I**, Freudenberger T, Twarock S, Fischer JW. Synergistic effect of targeting epidermal growth factor receptor and hyaluronan synthesis in esophageal squamous cell carcinoma cells. [in Revision]

## Kongressbeiträge

Kretschmer I, Freudenberger T, Twarock S, Fischer JW. 371: Esophageal squamous cell carcinoma cells stimulate the formation of a hyaluronan-rich microenvironment: implications for fibroblast phenotype and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. Eur J Cancer. 2014;50(Suppl.5):S89.

Kretschmer I, Freudenberger T, Twarock S, Fischer JW. Combined EGF receptor tyrosine kinase inhibition and inhibition of hyaluronan synthesis attenuates growth of esophageal squamous cell carcinoma cells in vitro. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2014;387(Suppl.1):S59.

Kretschmer I, Fischer JW. Role of hyaluronan in esophageal squamous cell carcinoma. Hyaluronan Symposium, Schloss Mickeln, 25.01.2014, Düsseldorf.

Kretschmer I, Kuger P, Freudenberger T, Twarock S, Fischer JW. Esophageal squamous cell carcinoma cells stimulate cancer-associated fibroblasts to form a hyaluronan-rich microenvironment. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2013;386(Suppl.1):S44.

Kretschmer I, Dai G, Grandoch M, Fischer JW. Regulation and subcellular localization of a truncated hyaluronic acid synthase isoenzyme. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2012;385(Suppl.1):S48.

### Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer, möchte ich sehr für die Betreuung der vorliegenden Arbeit danken. Insbesondere die fachlichen Diskussionen, die stets motivierenden Gespräche und das Ermöglichen des Forschungsaufenthalts in Kuopio, Finnland, waren sehr hilf- und lehrreich und haben zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen. Ich möchte mich auch für das mir von Anfang an entgegengebrachte Vertrauen und die mir gewährten Freiräume bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem Frau Prof. Raija Tammi und Herrn Prof. Markku Tammi von der Universität von Ost-Finnland, für die vorübergehende Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und ihre große Hilfe bei der Charakterisierung der HAS3 Isoform b in COS-1-Zellen. Die Möglichkeit, andere Techniken und Arbeitsweisen kennenzulernen war sehr wertvoll für mich. Geneviève Bart und Ashik Jawahar Deen möchte ich sehr für ihre intensive Betreuung bei den FRET-Experimenten und den Experimenten zur HA-Synthese und Lokalisierung der HAS3 Isoform b danken. Auch außerhalb des Labors habe ich mich bei ihnen und den anderen Mitgliedern des Anatomie-Instituts willkommen gefühlt und möchte mich bei allen für die schöne und interessante Zeit bedanken.

Petra Rempel möchte ich für ihre großartige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente danken. Ihr Know-how war eine große Bereicherung! Vielen Dank auch an Irmhild Rüter und Rikka Kärnä für die ELISA-Messungen.

Alle Kolleginnen und Kollegen sind mir über die Zeit sehr ans Herz gewachsen und ich möchte allen für die schöne, unvergessliche Zeit und die tolle Zusammenarbeit danken. Eine Lösung für alle administrativen Probleme kannten Erika Lohmann und Karin Montag und im Labor waren Andrea Neinhuis, Annika Zimmermann, Bärbel Reupert, Beate Weyrauther, Kerstin Freidel und Peggy Marra-Mann stets hilfsbereit. Ich bin dankbar für die anregenden fachlichen Diskussionen, die motivierenden Gespräche und die vielen schönen Erlebnisse die ich mit den langjährigen Mitdotorandinnen Julia Müller, Lena Dick, Nina Pasch, Christina Klatt, Kathrin Feldmann, Alexandra Schütze und Julia Bayer teilen durfte. Von Herzen danke ich auch Maria Grandoch sowie Till Freudenberger und Sören Twarock für ihre Hilfe jeglicher Art.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner lieben Familie, Martin Panitz und meinen guten Freunden für ihre fortwährende Unterstützung, ihre Geduld und ihr großes Verständnis bedanken.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

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

Düsseldorf, den

Inga Kretschmer