

Die Rolle der Hyaluronsäure in der Tumorprogression und der Tumor-Stroma-Interaktion

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Christian Vogeley

aus Dormagen

Düsseldorf, Februar 2018

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

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Kassack

Tag der mündlichen Prüfung: 06. September 2018

Zusammenfassung

Tumorerkrankungen stellen eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar, wobei 90 % der Todesfälle aus den durch Metastasierung entstandenen Sekundärtumoren resultieren. Sowohl die Tumorprogression, als auch die Metastasierung eines Tumors wird durch das umliegende Gewebe beeinflusst, das sich aus stromalen Zellen, Blutgefäßen und der extrazellulären Matrix (EZM) zusammensetzt. Ein Hauptbestandteil der EZM ist die Hyaluronsäure (HA), wobei es sich um ein unverzweigtes Polysaccharid handelt, welches die Tumorprogression unterstützen kann. Mesenchymale Stammzellen (MSC), als Bestandteil der Mikroumgebung des Tumors, fördern zusätzlich das Tumorwachstum aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die HA-System assoziierten Gene der HA-Synthase 3 (*HAS3*), Hyaluronidase 1 (*HYAL1*) und -2 (*HYAL2*) im Vergleich zu normalen humanen epithelialen Keratinozyten (NHEK) überexprimiert sind. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die nach Spaltung durch *HYAL1* entstehende niedermolekulare HA (LMW-HA) zu einer Aktivierung der anti-apoptotischen TLR4-TAK1-Signalkaskade führte. Somit induzierte die Herabregulierung von *HYAL1* in der Plattenepithelkarzinomzelllinie A431, jedoch nicht in NHEKs oder humanen dermalen Fibroblasten (NHDF), einen apoptotischen Phänotyp. Die Abhängigkeit der TAK1-Aktivierung konnte immunhistologisch in humanen Proben von Patienten mit *M. Bowens* oder kutanem Plattenepithelkarzinom (kPEK) bestätigt werden. Des Weiteren führte die Modulation des HA-Systems durch den HAS-Inhibitor 4-Methylumbelliferon (4-MU) und den Hyaluronidase-Inhibitor Ascorbinsäurepalmitat (Vcpal) zu einer erhöhten Apoptoserate *in vitro* und zu einem reduzierten Tumorwachstum *in vivo*.

Untersuchungen der Tumor-Stroma-Interaktion ergaben, dass die Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 die HA-Synthese in Knochenmarks-isolierten MSCs (bmMSC) induzierten, wohingegen die Gliomblastomzelllinie U87-MG auf die HA-Produktion keinen Einfluss hatte. Zusätzlich inhibierten MDA-MB-231-Zellen die adipogene Differenzierung der bmMSCs. Ein genereller Einfluss der HA in der Aufrechterhaltung des pluripotenten Potentials der bmMSCs wurde durch die erhöhte adipogene Differenzierung nach Stimulation mit 4-MU nachgewiesen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass adipogen differenzierte MSCs (adipoMSC) ein reduziertes immunmodulatorisches Potential aufwiesen und die Proliferation der Tumorzellen reduzierten.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der HA in der Tumorprogression dargestellt. LMW-HA aktivieren eine anti-apoptotische Signalkaskade in PEK-Zellen. Die Induktion der HA-Synthese in bmMSCs durch invasive Mammakarzinom-Zellen führt zu einer reduzierten adipogenen Differenzierung.

Dadurch etablieren diese Zellen möglicherweise die eigene pre-metastatische Nische durch die Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Potentials der bmMSCs.

Summary

Cancer is one of the major causes of death worldwide. Metastasis resulting from a primary tumour, are responsible for 90% of human cancer deaths. Both tumour progression and metastasis are influenced by the tumour microenvironment, which is composed of stromal cells, blood vessels, cytokines and the extracellular matrix (ECM). The ECM-molecule Hyaluronic acid (HA) is an unbranched polysaccharide and was shown to have various tumorigenic properties. Mesenchymal stem cells (MSC) are able to infiltrate the tumour stroma and promote tumour growth mainly by their immunosuppressive potential.

Here, comparison of mRNA expression revealed an increase of the hyaluronan (HA) associated genes Hyaluronan-Synthase 3 (*HAS3*), Hyaluronidase 1 (*HYAL1*) and Hyaluronidase 2 (*HYAL2*) in the cutaneous squamous cell cancer (cSCC) cell line A431 compared with normal epithelial keratinocytes (NHEK). Low molecular weight HA (LMW-HA) generated by *HYAL1* activated the anti-apoptotic TLR4-TAK1 signalling pathway. Interference of the *HYAL1*-expression by siRNA induced an apoptotic phenotype in A431 cells, whereas non-cancerous cells were not affected. Human samples taken from patients diagnosed with either M. Bowen or SCC, showed a positive correlation between *HYAL1*-expression and TAK1-activation. The pharmacological modulation of the HA-system with the HAS-inhibitor 4-methylumbelliferone (4-MU) or the Hyaluronidase-inhibitor ascorbic acid 6-palmitate (Vcpal) induced apoptosis in A431 cells *in vitro* and reduced tumour progression *in vivo*.

Investigations of the tumour-stroma-interaction revealed that the breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 induced HA-synthesis in bone marrow derived MSCs (bmMSC), whereas the glioblastoma cell line U87-MG had no influence on HA-production. Additionally, MDA-MB-231 cells were able to inhibit adipogenic differentiation of bmMSCs. A general role of HA in maintaining the stemness of bmMSCs could be shown by inducing differentiation in the presence of 4-MU which enhanced the adipogenic differentiation potential. Furthermore, it was shown that adipogenic differentiated bmMSCs have a reduced immunomodulatory potential and inhibit the proliferation of tumour cells.

In this thesis, two different mechanisms were investigated how HA contributes to tumour progression. In cSCC LMW-HA activates an anti-apoptotic signalling pathway and supports tumour survival. The induction of HA-synthesis in bmMSCs by invasive breast cancer cells interferes with the adipogenic differentiation potential and maintains the immunomodulatory potential. Thereby, invasive breast cancer cells may be able to create a pre-metastatic microenvironment.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung..... 1

Summary..... 1

Inhaltsverzeichnis..... IV

Abbildungsverzeichnis..... IX

Tabellenverzeichnis..... XII

Abkürzungsverzeichnis XIII

1. Einleitung 1

 1.1. Karzinome 1

 1.1.1. Plattenepithelkarzinom der Haut..... 1

 1.1.2. Mammakarzinom..... 2

 1.1.3. Glioblastoma multiforme..... 3

 1.1.4. Die Rolle der Mikroumgebung des Tumors in Tumorprogression und Metastasierung..... 3

 1.2. Mesenchymale Stammzellen 5

 1.2.1. Immunsuppressives Potential mesenchymaler Stammzellen..... 5

 1.2.2. Tumorassoziierte MSCs 6

 1.3. Hyaluronsäure 7

 1.3.1. Hyaluronsäuresynthesen..... 8

 1.3.2. Hyaluronidasen 11

 1.3.3. Die Rolle der Hyaluronidasen in der Tumorprogression..... 12

 1.3.4. Degradation der Hyaluronsäure im Tumor..... 13

 1.3.5. Ascorbinsäurepalmitat..... 14

 1.4. Ziele der Arbeit 15

2. Material und Methoden..... 16

 2.1. Material..... 16

 2.1.1. Zelllinien und Zellkultur Materialien..... 16

 2.1.2. Antikörper..... 17

 2.1.3. Inhibitoren und Stimulantien 18

| | |
|---|----|
| 2.1.4. Puffer | 18 |
| 2.1.5. Primer | 19 |
| 2.2. Methoden..... | 20 |
| 2.2.1. Zellkultur..... | 20 |
| 2.2.2. Bestimmung der Zellzahl | 20 |
| 2.2.3. Stimulierung von Zellen | 20 |
| 2.2.4. Herstellung von Überständen | 20 |
| 2.2.5. Transfektion | 20 |
| 2.2.6. Bestimmung der Proliferationsrate..... | 21 |
| 2.2.7. Quantifizierung der sezernierten Hyaluronsäure im Überstand..... | 21 |
| 2.2.8. Adipogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen mit anschließender Öl Rot O Färbung..... | 22 |
| 2.2.9. Osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen mit anschließender Alizarin S Färbung..... | 23 |
| 2.2.10. Quantifizierung der osteogenen Differenzierung mittels Bestimmung der Calcium-Konzentration | 23 |
| 2.2.11. T-Zell-Proliferations-Analyse zur Ermittlung des immun-suppressiven Potential von MSCs..... | 23 |
| 2.2.12. Zeitraffer-Mikroskopie zur Bestimmung der Motilität | 24 |
| 2.2.13. Nicoletti Untersuchung zur Bestimmung der apoptotischen Fraktion | 24 |
| 2.2.14. Immunzytochemische Färbung..... | 25 |
| 2.2.15. Färbung der Lysosomen lebender Zellen | 25 |
| 2.2.16. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Reaktion | 25 |
| 2.2.17. Immunoblot | 26 |
| 2.2.18. Signaltransduktionsanalyse | 27 |
| 2.2.19. Semiquantitative mRNA-Expressionsanalysen (qRT-PCR) | 27 |
| 2.2.20. Immunhistochemische Färbung von Cryo-Präparaten mit DAB | 28 |
| 2.2.21. Immunhistochemische Färbung mit DAB von Paraffinschnitten | 29 |
| 2.2.22. Affinitätszytochemie von HA | 29 |

| | |
|--|----|
| 2.2.23. Murines Xenograft Model der humanen Plattenepithelkarzinom Zelllinie A431 | 29 |
| 2.2.24. Statistik..... | 30 |
| 3. Ergebnisse | 31 |
| 3.1. Der Einfluss der Hyaluronsäure auf die Progression von Plattenepithelkarzinomen der Haut..... | 31 |
| 3.1.1. Die veränderte Extrazellulärmatrrix im kutanen Plattenepithelkarzinom im Vergleich zu Keratinozyten..... | 31 |
| 3.1.2. Der Knockdown von Hyal1 führt zu einem apoptotischen Phänotyp in A431 Zellen | 32 |
| 3.1.3. Reduktion der HYAL1-Expression beeinflusst die Größe von Lysosomen .. | 35 |
| 3.1.4. Reduktion der HYAL1-Expression beeinflusst die Aktivierung von TAK1 | 36 |
| 3.1.5. Einfluss von Hyal1 auf die Expression anti-apoptotischer Gene | 39 |
| 3.1.6. Hyal1 reguliert die Aktivierung von TAK1 über den Toll-ähnlichen Rezeptor 4 | 40 |
| 3.1.7. Pharmakologische Modulation des Hyaluronsäuresystems der A431 Zellen induziert Apoptose | 42 |
| 3.1.8. Einfluss der Hyaluronsäure auf die Motilität von A431 Zellen | 44 |
| 3.1.9. Auswirkung der Inhibition von TAK1, der Hyaluronsäure-Synthese und der Hyaluronidasen im A431 Xenograft Regressionsmodell | 45 |
| 3.1.10. Expression von HYAL1 korreliert mit der Phosphorylierung von TAK1 in Plattenepithelkarzinomen in vivo | 49 |
| 3.1.11. 4-MU reduziert die Phosphorylierung von TAK1 in vivo im UV-induzierten Plattenepithelkarzinom | 52 |
| 3.1.12. Zusammenfassung I | 54 |
| 3.2. Die Rolle der HA in der Interaktion zwischen Tumorzellen und mesenchymalen Stammzellen | 54 |
| 3.2.1. Brusttumorzellen induzieren die HA-Synthese der MSCs | 54 |
| 3.2.2. Einfluss der MSCs auf die Motilität von Tumorzellen | 57 |
| 3.2.3. Inhibition der HA induziert die adipogene Differenzierung der MSCs | 59 |
| 3.2.4. MDA-MB-231 Zellen inhibieren die adipogene Differenzierung der MSCs .. | 60 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.5. Einfluss adipogen differenzierter MSCs auf Tumorzellen..... | 62 |
| 3.2.6. Adipogen differenzierte MSCs verlieren ihr immunmodulatorisches Potential | 64 |
| 3.2.7. Zusammenfassung II..... | 67 |
| 4. Diskussion..... | 68 |
| 4.1. Einfluss der Hyaluronsäure auf die Tumorprogression kutaner Plattenepithelkarzinome..... | 68 |
| 4.1.1. Einfluss der Hyaluronsäure-Matrix auf die Progression von Plattenepithelkarzinomen in vitro..... | 68 |
| 4.1.2. HYAL1 aktiviert eine anti-apoptotische Signalkaskade in Plattenepithelkarzinomen in vitro..... | 70 |
| 4.1.3. Auswirkungen der Interaktion des Hyaluronsäure-Systems mit TAK1 auf die Progression kutaner Plattenepithelkarzinome in vivo..... | 73 |
| 4.1.4. Modulation der Hyaluronsäure-Matrix als therapeutischer Ansatz zur Reduktion der Progression kutaner Plattenepithelkarzinome..... | 73 |
| 4.2. Einfluss der Hyaluronsäure auf die Interaktion zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen..... | 76 |
| 4.2.1. Hyaluronsäure beeinflusst die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Adipozyten..... | 76 |
| 4.2.2. Mammakarzinomzellen modulieren die Hyaluronsäure-Matrix und das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen | 76 |
| 4.2.3. Mesenchymale Stammzellen reduzieren die Motilität invasiver Mammakarzinomzellen | 78 |
| 4.2.4. Adipogen differenzierte Stammzellen verlieren ihre tumorfördernden Eigenschaften | 79 |
| 4.2.5. Invasive Mammakarzinomzellen erhalten das immunsuppressive Potential mesenchymaler Stammzellen | 80 |
| 4.3. Einfluss der Hyaluronsäure auf die Tumorprogression und Metastasierung (Zusammenfassung)..... | 83 |
| 5. Literaturverzeichnis | 84 |
| 6. Appendix | 101 |
| 7. Veröffentlichungen | 105 |

| | |
|------------------------------------|-----|
| 8. Danksagung | 107 |
| 9. Eidesstattliche Erklärung | 108 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Aufbau der Haut modifiziert nach Neill et al., 2012 [5]..... | 1 |
| Abbildung 2: Chemische Struktur der Hyaluronsäure. | 8 |
| Abbildung 3: Chemische Struktur von A, 4-Methylumbelliferon und B, 4-Methylumbelliferon-Glucuronsäure..... | 10 |
| Abbildung 4: Chemische Struktur von A, L-Ascorbinsäure und B, Ascorbinsäurepalmitat | 14 |
| Abbildung 5: Vergleich der Expression von EZM-assoziierten Genen. | 31 |
| Abbildung 6: Die Herabregulierung der Transkription von <i>HYAL1</i> führt zu einem apoptotischen Phänotyp in A431 Zellen. | 33 |
| Abbildung 7: Herabregulierung der Expression von HAS3 führt zu einer reduzierten Sezernierung der HA in den Überstand. | 34 |
| Abbildung 8: Herabregulierung von <i>HYAL1</i> in den nicht transformierten Zelllinien NHEK und NHDF führt zu keinem apoptotischen Phänotyp. | 35 |
| Abbildung 9: Reduktion der <i>HYAL1</i> -Expression in A431 Zellen führt zu einer Vergrößerung der Lysosomen. | 36 |
| Abbildung 10: Untersuchung apoptotischer Signalwege in <i>siHYAL1</i> transfizierten A431 Zellen. | 37 |
| Abbildung 11: Der apoptotische Phänotyp nach <i>siHYAL1</i> ist abhängig von der Aktivierung von TAK1. | 38 |
| Abbildung 12: Inhibition der Aktivierung von TAK1 führt zu einem apoptotischen Phänotyp in A431 Zellen. | 39 |
| Abbildung 13: Der Einfluss von <i>HYAL1</i> auf NFκB Effektorgene..... | 40 |
| Abbildung 14: Inhibition des Toll-ähnlichen Rezeptors 4 (TLR4) reduziert die Phosphorylierung von TAK1 und führt zu einem apoptotischen Phänotyp in A431 Zellen. | 41 |
| Abbildung 15: Pharmakologische Modulation des HA-Systems führt zu einem TAK1- abhängigen apoptotischen Phänotyp. | 43 |
| Abbildung 16: Pharmakologische Inhibition der Hyaluronidasen führt zu einer Vergrößerung der Lysosomen. | 44 |
| Abbildung 17: Das HA-System beeinflusst nicht die Motilität von A431 Zellen in vitro. | 45 |
| Abbildung 18: 4-MU reduziert das Wachstum von A431 Zellen im murinen Xenograftmodell. | 46 |
| Abbildung 19: In 40% Cyclodextrin gelöstes Vcpal induziert Apoptose in A431 Zellen in vitro. | 47 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 20: Vcpl reduziert das Wachstum von A431 Zellen im murinen Xenograftmodell. | 48 |
| Abbildung 21: Inhibition von TAK1 reduziert das Wachstum von A431 Zellen im murinen Xenograftmodell. | 49 |
| Abbildung 22: Die Phosphorylierung von TAK1 korreliert mit der Expression von HYAL1 in M. Bowen und Plattenepithelkarzinomen. | 51 |
| Abbildung 23: Pharmakologische Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU reduziert die UVB-induzierte Tumorinduktion. | 53 |
| Abbildung 24: Durch Mammakarzinomzellen konditionierter Überstand steigert die HA-Synthese in bmMSCs. | 55 |
| Abbildung 25: Mesenchymale Tumorzellen interagieren eng mit bmMSCs. | 56 |
| Abbildung 26: Die Tumorzelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U87-MG haben keinen Einfluss auf die Motilität von bmMSCs. | 57 |
| Abbildung 27: BmMSCs reduzieren die Motilität der Zelllinie MDA-MB-231. | 58 |
| Abbildung 28: 4-MU steigert die adipogene Differenzierung der bmMSCs. | 60 |
| Abbildung 29: Die osteogene Differenzierung wird nicht von Tumorüberständen beeinflusst. | 61 |
| Abbildung 30: Die invasive Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 inhibiert die adipogene Differenzierung der bmMSCs. | 62 |
| Abbildung 31: Einfluss einer adipogenen Differenzierung auf die bmMSC-Tumorzell-Interaktion. | 63 |
| Abbildung 32: Überstand von adipoMSCs reduziert die Proliferation von Mammakarzinomzellen. | 64 |
| Abbildung 33: Adipogene Differenzierung der bmMSCs reduziert den immunmodulatorischen Effekt und führt zu einer vermehrten T-Zell Proliferation. | 65 |
| Abbildung 34: MDA-MB-231 konditioniertes Medium erhält das immunmodulatorische Potential von bmMSCs. | 66 |
| Abbildung 35: Das immunmodulatorische Potential der bmMSCs korreliert mit dem Grad der adipogenen Differenzierung. | 67 |
| Abbildung 36: In kutanen PEK interagiert LMW-HA mit TLR und fördert TAK1-vermittelt das Zellüberleben. | 75 |
| Abbildung 37: Einfluss der Zelllinien MDA-MB-231 und U87-MG auf mesenchymale Stammzellen. | 82 |
| Abbildung 38: Charakterisierung des Wachstumsverhaltens und des Überstandes der Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U87-MG. | 101 |
| Abbildung 39: Einfluss einer Stimulation von CD3+ T-Zellsuspension mit α CD3 und α CD28. | 102 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 40: Einfluss der adipogenen Differenzierung auf das immunmodulatorische Potential mesenchymaler Stammzellen..... | 103 |
| Abbildung 41: Durch MDA-MB-231 konditioniertes Medium erhält das immunmodulatorische Potential mesenchymaler Stammzellen | 104 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Liste der untersuchten Zelllinien | 16 |
| Tabelle 2: Liste der untersuchten Primärzellen | 16 |
| Tabelle 3: Verwendete Basismedien | 16 |
| Tabelle 4: Auflistung und Verwendung der in dieser Arbeit verwendeten Erstantikörper | 17 |
| Tabelle 5: Auflistung und Verwendung der in dieser Arbeit verwendeten Zweitantikörper..... | 17 |
| Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren und Stimulantien..... | 18 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer | 18 |
| Tabelle 8: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer für die qRT-PCR..... | 19 |
| Tabelle 9: Für die Transfektion verwendete siRNAs | 21 |
| Tabelle 10: Substanzen für die adipogene Differenzierung..... | 22 |
| Tabelle 11: Substanzen für die osteogene Differenzierung..... | 23 |
| Tabelle 12: Präparation der BSA Standardreihe | 25 |
| Tabelle 13: Zusammensetzung eines Sammelgels (5%) | 26 |
| Tabelle 14: Zusammensetzung der Trenngele verschiedener Konzentrationen..... | 26 |
| Tabelle 15: Substanzen für die Behandlung und Art der Applikation des A431 Xenograft Models | 30 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| 4-MU | 4-Methylumbelliferone |
| α SMA | Glattmuskuläres Aktin α |
| ABC | ATP-bindende Kasette |
| adipoMSC | Adipogen differenzierte mesenchymale Stammzellen |
| AK | Aktinische Keratose |
| ANOVA | <i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse) |
| APC | Antigen-präsentierende Zelle |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BMDC | Aus dem Knochenmark-stammende Zellen |
| BMI | <i>Body Mass Index</i> |
| bmMSC | Knochenmark-isolierte mesenchymale Stammzellen |
| BMP | Knochenmorphogenetisches Protein |
| BRCA1 | <i>Breast Cancer 1</i> |
| BRCA2 | <i>Breast Cancer 2</i> |
| BSA | <i>Bovines</i> Serumalbumin |
| BTH | <i>Bovine</i> Hyaluronidase |
| CAF | Karzinom-assoziierte Fibroblasten |
| CCL | Chemokin (C-C Motif) Ligand |
| cDNA | Komplementäre DNA |
| CFSE | 5(6)-Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidylester |
| CHIP | Chromatin-Immunpräzipitation |
| COL | Kollagen |
| CSF-1 | Koloniestimulierender Faktor 1 |
| CSPG | Chondroitinsulfat-Proteoglykan |
| C_t | <i>Cycle threshold</i> |
| Da | Dalton |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DC | Dendritische Zelle |
| DEC | Decorin |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EC | <i>Enzyme Commision</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor |
| EGR-1 | Protein der frühen Wachstumsreaktion 1 |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i> |
| ER | Östrogenrezeptor |
| ERK | Extrazelluläre Signal-aktivierte Kinase |
| ES | Embryonale Stammzellen |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| FCS | Fetales bovines Serum |
| FGF-2 | Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 |
| FN | Fibronektin |
| FOXP3 | <i>Forkhead box 3</i> |
| GAG | Glykosaminoglykan |
| GBM | Glioblastoma multiforme |
| GlcNAc | Acetylglucosamin |
| GlcUA | Glucuronsäure |
| GPI | Glycosylphosphatidylinositol |
| GTPase | Guanosintriphosphat Hydrolase |

| | |
|------------------|---|
| GvHD | <i>Graft-versus-host</i> Reaktion |
| Gy | Gray |
| HA | Hyaluronsäure |
| HAS | Hyaluronsäure-Synthasen |
| HABP | Hyaluronsäure-Bindeprotein |
| HARE | HA-Rezeptor für Endozytose |
| HO-1 | Hämoxygenase-1 |
| HER2 | Humane epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor 2 |
| HMW-HA | Hochmolekulare HA |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase |
| HSC | Hämatopoetische Stammzellen |
| HSP72 | Hitzeschockprotein 72 |
| HSPG | Heparansulfat Proteoglykan |
| HYAL | Hyaluronidase |
| IkB | <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i> |
| IAP | Apoptose-Inhibitor |
| IC ₅₀ | Mittlere inhibitorische Konzentration |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgG | Immunglobulin M |
| IHC | Immunhistochemie |
| IKK | IkB-Kinase |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IL-12 | Interleukin-12 |
| IL-17 | Interleukin-17 |
| iPS | Induzierte pluripotente Stammzellen |
| ISCT | <i>International Society for Cellular Therapy</i> |
| KD | <i>Knock down</i> |
| KGF | Keratinozyten Wachstumsfaktor |
| KGM | Keratinozyten Wachstumsmedium |
| KRAS | <i>Kirsten rat sarcoma</i> |
| LANUV | Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen |
| LMW-HA | Niedermolekulare Hyaluronsäure |
| LYVE | Endothelialer Hyaluronsäurerezeptor 1 der Lymphgefäße |
| M | mol/L |
| MDSC | Myeloide Suppressorzellen |
| MET | <i>Mesenchymal-to-epithelial transition</i> |
| Mio | Millionen |
| MMP | Matrix-Metalloprotease |
| mRNA | <i>Messenger</i> Ribonukleinsäure |
| MSC | Mesenchymale Stammzellen |
| MST | Durchschnittliche Überlebenszeit, <i>Mean Survival Time</i> |
| NF κ B | <i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| NHDF | Normale humane dermale Fibroblasten |
| NHE1 | Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher |
| NHEK | Normale humane epitheliale Keratinozyten |
| NMRI | <i>Naval medical research institute</i> |
| NSCLC | Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom |
| OPN | Osteopontin |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PARP | Poly(ADP-ribose)-Polymerase |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |

| | |
|-------------------|--|
| PDGF | Thrombozyten freigesetzter Wachstumsfaktor |
| PGF | Plazentaler Wachstumsfaktor |
| PEK | Plattenepithelkarzinom |
| PPAR γ | Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ |
| PR | Progesteronrezeptor |
| qRT-PCR | quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion |
| RAS | <i>Rat sarcoma</i> |
| RAF | <i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> |
| RHAMM | Rezeptor für HA-vermittelte Motilität |
| RIPA | Radioimmunopräzipitations Assay |
| RPMI | <i>Roswell park memorial institute</i> |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SEM | Standardfehler des Mittelwerts |
| siRNA | kurze interferierende Ribonukleinsäure |
| TAB | TAK1-Bindeprotein |
| TAK1 | Transformierender Wachstumsfaktor β -aktivierte Kinase 1 |
| TA-MSC | Tumor-assoziierte mesenchymale Stammzellen |
| TB | TRIS-Borate |
| TBS | TRIS-gepufferte Salzlösung |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGF- β | Transformierender Wachstumsfaktor β |
| T _H 1 | T-Helfer 1 Zellen |
| T _H 2 | T-Helfer 2 Zellen |
| T _H 17 | T-Helfer 17 Zellen |
| TLR2 | Toll-ähnlicher Rezeptor 2 |
| TLR4 | Toll-ähnlicher Rezeptor 4 |
| TME | <i>Tumour Microenvironment</i> |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| TP53 | Tumor Protein p53 |
| TRAF6 | TNF Rezeptor-assoziiertes Faktor 6 |
| TRIS | Tris-aminomethan |
| TSG6 | TNF-stimuliertes Gen 6 |
| T _{reg} | Regulatorische T-Zellen |
| UDP | Uridindiphosphat |
| UVB | Ultraviolett B |
| Vc | Ascorbinsäure |
| Vcpal | Ascorbinsäurepalmitat |
| VEGF | Gefäßendothel-Wachstumsfaktor |
| VEGFR | Gefäßendothel-Wachstumsfaktor Rezeptor |
| WB | Western Blot |
| WHO | <i>World Health Organisation</i> |
| ZZuIV | Zusatzstoff-Zulassungsverordnung |

1. Einleitung

1.1. Karzinome

In der Medizin beschreibt der Begriff Karzinom eine Vielzahl von Erkrankungen, die durch maligne Neoplasien und die Verbreitung abnormaler Zellen charakterisiert sind. Jedes Organ kann von Karzinomzellen befallen werden, allerdings variieren die Inzidenzen je nach Alter, Geschlecht oder Region. Laut der *World Health Organisation* (WHO) sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit mit 8,8 Mio. Toten im Jahr 2015. Die Todesursache ist in den meisten Fällen jedoch nicht der entstandene Primärtumor, sondern in 90 % der Fälle die durch Metastasierung entstandenen Sekundärtumoren [1]. Der Prozess der Metastasierung beschreibt die Dissemination von Tumorzellen des Primärtumors und die Ausbildung eines Sekundärtumors in einem entfernten Organ [2]. Bereits 1889 stellte der Chirurg Stephen Paget einen Zusammenhang zwischen Tumorzellen und der Ausprägung einer Metastase in Abhängigkeit der Mikroumgebung eines Organs her [3].

1.1.1. Plattenepithelkarzinom der Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und besteht aus drei Schichten: Die *Epidermis* (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subkutis (Unterhaut). Die Epidermis besteht zu 90 – 95% aus Keratinozyten und ist über eine Basalmembran von der Dermis getrennt. In der untersten Schicht der Epidermis befinden sich die für die Proliferation verantwortlichen Stammzellen, die zur Oberfläche hin zu Keratinozyten ausdifferenzieren [4]. Diese werden von den basal neugebildeten Zellen nach Außen verdrängt und unterlaufen morphologischen und biochemischen Veränderungen.

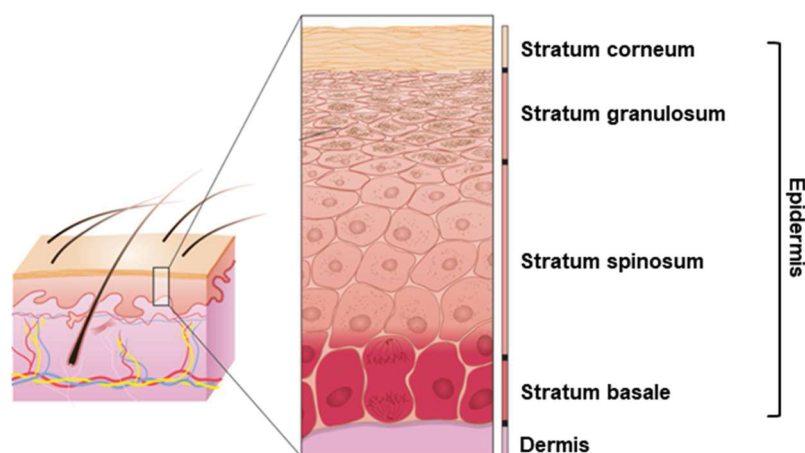


Abbildung 1: Aufbau der Haut modifiziert nach Neill *et al.*, 2012 [5]

Die Haut ist die erste Schutzbarriere vor äußeren Einflüssen, wie zum Beispiel Sonnenlicht. Die darin enthaltene UVB-Strahlung (280 – 315 nm) ist der prädominante Risikofaktor eines *Morbus Bowens*, der als ein frühes Stadium eines kutanen Plattenepithelkarzinoms (PEK) betrachtet wird [6]. Dabei handelt es sich um einen malignen Tumor, der ein destruierendes Wachstum aufweist, jedoch mit geringer Metastasierungstendenz. Liegt bei Erstdiagnose ein lokal begrenztes PEK vor, kann eine dauerhafte Heilung mit einer Wahrscheinlichkeit von 88-96% durch mikroskopische Chirurgie erreicht werden [7, 8]. Im Falle einer Metastasierung sinkt die 5-Jahresüberlebensrate auf 25-50%.

Für die Genese eines PEKs ist eine durch UVB-Strahlung initiierte Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53* essentiell. Dabei handelt es sich überwiegend um C→T oder CC→TT Basenwechsel in den konservierten Regionen III-V, die zu einer dominant-negativen Inaktivierung des Gens führen [6, 9]. Keratinozyten mit einer Mutation in *TP53* nach UVB-Bestrahlung durchlaufen den Prozess der Apoptose. Liegt jedoch bereits ein in seiner Funktion gestörtes TP53 vor, bevor die Zellen bestrahlt werden, wird dieses klonal auf die Tochterzellen vererbt und es resultiert die Ausbildung einer aktinischen Keratose (AK) [9]. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation weiterer genetischer Alterationen, die zu der Ausbildung eines malignen Tumors führen können [6, 10]. Dabei liegt die Rate, dass aus einer AK ein PEK entsteht, bei schätzungsweise 3-5 % [11]. Neben einem dysfunktionalen p53 wurde auch eine Überexpression der GTPase RAS in den meisten PEKs und dessen Vorstufen beobachtet, welche zu einer gesteigerten Proliferation, Angiogenese, Motilität und einer modulierten Immunantwort des Wirts führt [12, 13]. Des Weiteren konnte jüngst eine Veränderung der extrazellulären Matrix des PEKs im Vergleich zur gesunden Haut nachgewiesen werden (Doktorarbeit Kellner M. B., unveröffentlicht). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Hyaluronsäure-Synthase 3 (*HAS3*) und die Hyaluronsäure (HA)-degradierenden Enzyme Hyaluronidase1 und 2 (*HYAL1* und *HYAL2*) auf mRNA Ebene überexprimiert sind. Auf diese Enzyme wird im späteren Verlauf dieser Arbeit noch eingegangen.

1.1.2. Mammakarzinom

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Unter allen Brustkrebs-Patienten beträgt der Anteil der Männer circa 1 %. Schätzungsweise starben im Jahr 2011 über 508.000 Frauen an Brustkrebs (WHO), wobei die hauptsächliche Todesursache Metastasen in distal gelegenen Organen ist [14]. Die am häufigsten von einer Metastase betroffenen Organe sind bei einem Mammakarzinom die Leber, die Lunge, die Knochen und das Gehirn. Laut dem Robert Koch Institut gibt es jährlich ca. 70.000 Neuerkrankungen in Deutschland. Im Jahr 2005 ist die Zahl der

Neuerkrankungen mit der Einführung des Mammographie-Screenings sprunghaft angestiegen, jedoch sank damit einhergehend die Zahl der Todesfälle. Zu den Risikofaktoren gehören ein erhöhter *body mass index* (BMI), ein hormonelles Ungleichgewicht, zunehmendes Alter und eine genetische Prädisposition [15, 16]. Mehrere Gene werden mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in Verbindung gebracht. Darunter auch die Gene *BRCA1* (*breast cancer 1*) und *BRCA2* (*breast cancer 2*), welche eine wichtige Rolle bei der Behebung von Doppelstrangbrüchen der chromosomalen DNA spielen [17, 18].

Bei Mammakarzinomen unterscheidet man auf molekularer Ebene zwischen vier Unterklassen, die sich bezüglich Verhalten, Behandlung, Diagnose und Metastasierung unterscheiden. Für die Einstufung wurde die Expression der routinemäßig evaluierten Hormonrezeptoren (HR) Progesteronrezeptor (PR) und Östrogenrezeptor (ER), sowie der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) verwendet [19]. Hierbei ist insbesondere der dreifachnegative Brustkrebs zu erwähnen, der mit einer infausten Prognose einhergeht. Dieser exprimiert keinen der genannten Rezeptoren und spricht somit auf keine endokrine Therapie an [20].

1.1.3. Glioblastoma multiforme

Als Gliome werden eine Vielzahl verschiedener Hirntumore bezeichnet, die aus Gliazellen entstehen. Nach Angaben des Robert Koch Instituts wurden im Jahre 2012 über 7.000 Menschen in Deutschland mit einem Hirntumor diagnostiziert. Diese werden in der Klinik in vier Gruppen unterteilt, wobei die aggressivste Form der Stufe 4, auch als Glioblastoma multiforme (GBM) bekannt, die häufigste Form beim Menschen ist [21]. Die durchschnittliche Überlebenszeit (*mean survival time*, MST) eines mit GBM diagnostizierten Patienten liegt bei 0,4 Jahren [22]. Die Ausprägung einer extrakraniellen Metastase ist bei einem primären GBM sehr selten und wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,44 % beziffert [23]. Als Gründe werden die kurze Überlebenszeit, die Blut-Hirn-Schranke, das Immunsystem oder ein fehlendes lymphatisches System angeführt [24-27]. Die Zielorgane der Metastasen variieren stark und sind z. B. Lunge, Lymphknoten oder Knochen/Knochenmark [28].

1.1.4. Die Rolle der Mikroumgebung des Tumors in Tumorprogression und Metastasierung

Der Begriff *tumour microenvironment* (TME) beschreibt die Umgebung in der ein Tumor entsteht. Dazu gehören die umliegenden Blutgefäße, stromale Zellen, Signalmoleküle und die extrazelluläre Matrix (EZM). In den letzten Jahren erlangte die Erforschung des

TME als therapeutisches Ziel an Bedeutung, da aufgrund dessen genetischer Stabilität das Risiko einer therapeutischen Resistenz im Vergleich zu Tumorzellen geringer ist und für die Progression und Metastasierung essentielle Vorgänge in der Tumor-Stroma-Interaktion unterbunden werden können [29].

Bei der Etablierung einer tumorfördernden Nische im Organismus ist die Modulation des Immunsystems essentiell. Durch die Erschaffung eines hypoxischen Milieus werden *CD11b⁺/Ly6C^{med}/Ly6G⁺* myeloide Suppressorzellen (MDSC) rekrutiert, die die Zytotoxizität natürlicher Killerzellen (NK) beeinträchtigen [30]. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) supprimieren das Immunsystem ebenfalls, indem diese Prostaglandin E₂ sekretieren und die Angiogenese fördern [31, 32]. Des Weiteren beeinflusst das TME die Dissemination von Tumorzellen und die Metastasierung in entfernte Organe. Wie bereits in Abschnitt 1 erwähnt sind in 90% der Fälle ein metastatisches Tumorwachstum und die damit einhergehende eingeschränkte Funktion lebenswichtiger Organe letztlich die Todesursache von Krebserkrankungen [1]. Ein für die Metastasierung erforderliche Prozess ist die *epithelial-to-mesenchymal* Transition (EMT), wodurch Tumorzellen den direkten Zell-Zell-Kontakt zu benachbarten Zellen verlieren [33, 34]. EMT kann beispielsweise durch die Sekretion des transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β) induziert werden [34]. Diese losgelösten Tumorzellen sind in der Lage die EZM zu degradieren und in das Lymph- oder Blutgefäßsystem einzudringen [35, 36]. Darüber gelangen die Tumorzellen dann zu ihrer potentiell metastatischen Nische, wie Knochenmark, Lymphknoten oder Lunge. Die Metastasierung an sich ist jedoch ein höchst ineffektiver Prozess, da nur ca. 0,01 % aller disseminierten Zellen in der Lage sind eine Metastase auszubilden [37]. Der Großteil der gestreuten Zellen durchläuft den Prozess der Apoptose, den programmierten Zelltod. Der restliche Teil durchläuft entweder ein Ruhestadium (*tumour dormancy*) als einzelne Zelle, als mikrometastatische Läsion oder bildet direkt eine proliferierende Mikrometastase aus [38]. Es wird vermutet, dass sich die im Ruhestadium befindlichen Zellen nicht teilen. Daher wird angenommen, dass diese Zellen resistent gegen Chemotherapien sind und lange nach einer Therapie Rezidive ausbilden können [39, 40]. Am Beispiel des Lymphoms konnte gezeigt werden, dass durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), ein Angiogenese steigernder Stimulus, ruhende Tumorzellen reaktiviert werden [41]. Dabei wird die metastatische Nische durch den Primärtumor selbst vorbereitet. Die metastatische Nische wird durch VEGF-Rezeptor positive (VEGFR⁺), aus dem Knochenmark stammende Zellen (BMDCs) besiedelt, welche durch die Sekretion von VEGF des Primärtumors aktiviert werden [42]. Diese Beobachtung geht mit der bereits 1889 postulierten *seed-and-soil* Hypothese einher, die besagt, dass

Metastasen sich nur dort entwickeln, wo die durch den Primärtumor vorgegebene Mikroumgebung besonders günstig ist [3].

1.2. Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen oder mesenchymale Stromazellen (MSC) sind multipotente Vorläuferzellen des Bindegewebes, die sich durch ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential auszeichnen. Während mesenchymale Stammzellen erstmals 1974 beschrieben und aus dem Knochenmark isoliert wurden, können sie heute aus fast jedem Gewebe gewonnen werden [43-46]. Es gibt weder eine eindeutige Definition noch ein spezifisches Testverfahren, um MSCs in einer Mischpopulation zu identifizieren. Daher hat die *international society for cellular therapy* (ISCT) Kriterien zur Identifikation von MSCs definiert. Diese Zellen müssen: 1. plastische Adhärenz aufweisen, 2. eine gewisse Zusammensetzung von Zelloberflächenmarkern besitzen und 3. sich in Zelllinien der mesodermalen Abstammung, wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten ausdifferenzieren [47].

In den letzten Jahren ist das Interesse an MSCs als therapeutisches Werkzeug gestiegen, da deren Einsatz im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen (ES) nicht an ethische Richtlinien gebunden ist. Zudem ist bei der Verwendung von MSCs die Gefahr für die Entstehung eines Teratoms, wie bei induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), nicht gegeben. Derzeit laufen 602 registrierte Studien (clinicaltrials.gov) weltweit, in denen das Potential einer MSC-basierten Zelltherapie, insbesondere im Bereich der neurodegenerativen und Autoimmunerkrankungen, erhoben wird [48-50].

Die Aufgaben der MSCs sind vielfältig und nicht vollständig verstanden. Sie sind Vorläufer der nicht-hämatopoetischen Komponenten, wie Osteoblasten und Adipozyten, die die Hämatopoese im Knochenmark mitregulieren [51]. In Studien an lebenden Mäusen konnte gezeigt werden, dass aus MSCs differenzierte Osteoblasten durch direkten Zell-Zell-Kontakt mit hämatopoetischen Stammzellen (HSC) die Hämatopoese positiv regulieren, während Adipozyten die hämatopoetische Mikroumgebung negativ beeinflussen [52, 53].

1.2.1. Immunsuppressives Potential mesenchymaler Stammzellen

MSCs zeichnen sich durch ihr immunsuppressives Potential aus und modulieren sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem. Aufgrund dieser Eigenschaft finden sie in der Therapie der *Graft-versus-host* Reaktion (GvHD) nach allogener Transplantation Verwendung [54].

Die Regulation des adaptiven Immunsystems durch MSCs erfolgt über verschiedene Wege. Dabei ist insbesondere die Interaktion zwischen MSCs und T-Zellen für diese Arbeit von Bedeutung. MSCs sind in der Lage die Proliferation, die Interferon- γ Produktion und die Zytotoxizität von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen zu hemmen [55]. In Krankheitsmodellen, die ein Ungleichgewicht zwischen T Helfer 1 (T_H1)- und T Helfer 2 (T_H2)- Zellen aufweisen, wie bei Arthritis (Überschuss an T_H1- Zellen) oder bei einer allergischen Reaktion (Überschuss an T_H2- Zellen), kann dieses durch MSCs wieder hergestellt werden [56, 57]. Das immunsuppressive Potential wird dadurch verstärkt, dass MSCs in der Lage sind konventionelle T-Zellen in sog. regulatorische T-Zellen (T_{reg}) umzuwandeln. Dabei handelt es sich um eine Population von T-Zellen, die suppressiv auf das Immunsystem wirken. *In vitro* Modelle deuten darauf hin, dass in Abhängigkeit von der Hämoxygenase-1 (HO-1) CD25⁺FOXP3⁺ T_{reg}-Zellen induziert werden [58]. T-Zellen sind die wesentlichen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems und werden durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) gesteuert. Dendritische Zellen (DCs) sind in der Lage Antigene zu erwerben und zu prozessieren. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass MSCs mit der Sekretion von Interleukin-12 (IL-12), einem tumorsupprimierenden Zytokin, und der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen durch DCs interferieren [59, 60]. Über die Ausschüttung von TGF- β wird die Differenzierung von CD4⁺ in *forkhead box 3* positive (FOXP3⁺) in T_{reg}-Zellen induziert, während die Differenzierung dieser Vorläuferzellen in T-Helfer 17 (T_H17)- Zellen unterdrückt wird [61]. Diese haben ihren Namen aufgrund der hohen Expression und Sekretion des Zytokins Interleukin-17 (IL-17) erhalten. Auf den MSCs selbst ist der IL-17 Rezeptor (IL-17R) stark exprimiert, wodurch die Proliferation der MSCs dosisabhängig von IL-17 gesteigert wird [62]. Dadurch kommt es zu einer negativen Rückmeldung (*feedback loop*) die dafür sorgt, dass die Population der T_H17- Zellen verringert wird, da unter anderem die Umprogrammierung der T_H17- Zellen in T_{reg}-Zellen durch MSCs vermittelt wird [63].

1.2.2. Tumorassoziierte MSCs

Insbesondere aufgrund der in Kapitel 1.2.1 beschriebenen immunsuppressiven Eigenschaften sind MSCs wichtige Regulatoren des Überlebens, der Proliferation und der Migration eines Tumors und vermitteln zudem Therapieresistenzen. Es konnte gezeigt werden, dass MSCs von einem Tumor rekrutiert werden können und in Tumorassoziierte MSCs (TA-MSC) oder Karzinom-assoziierte Fibroblasten (CAF) differenzieren. Somit sind sie in der Lage Einfluss auf die inflammatorische Mikroumgebung zu nehmen. Der Begriff TA-MSC bezieht sich nicht allein auf die Lokalisation der MSCs, sondern auch auf veränderte Eigenschaften der Stammzellen. Im humanen Ovarialkarzinom wurde bei TA-MSCs ein signifikanter Anstieg des

Knochen-morphogenetischen Proteins (BMP) nachgewiesen, welches die Differenzierung der MSCs zu vorwiegend Osteoblasten kontrolliert. In Reaktion auf das hypoxische Milieu oder auf den Tumornekrosefaktor α (TNF α) sezernieren TA-MSCs Chemokine der CC- und CXC- Familie oder Zytokine, wie den Koloniestimulierenden Faktor 1 (CSF1). Dadurch werden verschiedene Zellarten des angeborenen Immunsystems, wie Neutrophile, MDSC, Monozyten und Makrophagen rekrutiert [64-66]. Bei Makrophagen induzieren TA-MSCs eine phänotypische Veränderung (*switch*) von den nicht-tumorfördernden M1-Makrophagen hin zu den tumorfördernden M2-Makrophagen [67]. Der Einfluss der TA-MSCs auf das adaptive Immunsystem ähnelt dem der MSCs (s. auch Kapitel 1.2.1).

Auch die Angiogenese wird durch TA-MSCs beeinflusst. Es ist bisher nicht klar, inwieweit die Angiogenese eines Tumors durch TA-MSCs behindert oder unterstützt wird. Kolonkarzinomzellen, die zusammen mit MSCs injiziert wurden, weisen eine erhöhte mikrovaskuläre Dichte auf, wohingegen in Glioblastomen die Vaskularisierung reduziert ist [68, 69].

MSCs bzw. TA-MSCs begünstigen die Metastasierung von Tumorzellen und kreieren eine pre-metastatische Nische. Die Produktion von TGF- β induziert in Tumorzellen EMT, wodurch diese Zellen einen invasiven Phänotyp erhalten [70]. Diese pro-metastatischen Eigenschaften werden wiederum durch die tumorzelleigene Sekretion von Osteopontin (OPN) und des plazentaren Wachstumsfaktors (PIGF) gefördert [71, 72]. TA-MSCs sind in der Lage primäre Tumorzellen parakrin zu beeinflussen und Chemokin-vermittelt eine pre-metastatische Nische zu modellieren. Dies führt zur Rekrutierung von MDSCs, T_{reg}-Zellen und M2-Makrophagen [73, 74]. Durch die zusätzliche Sekretion von Matrix-Metalloproteasen wird die lokale EZM degradiert und die Infiltration der pre-metastatischen Nische durch die Tumorzellen begünstigt [75]. Um etwaige metastatische Tumorzellen, die in Ermangelung von Nährstoffen inaktiv sind (*tumour dormancy*), zu reaktivieren, infiltrieren VEGFR-positive Stammzellen die metastatische Nische und fördern dort die Angiogenese [42]. Interessanterweise wurde *in vitro* am Model des Mammakarzinoms gezeigt, dass MSCs exosomal die Expression von VEGF und somit die Angiogenese reduzieren [76].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MSCs die Tumorprogression und Metastasierung fördern, jedoch in Bezug auf die Angiogenese dichotome Eigenschaften in Abhängigkeit vom Tumormodel aufweisen.

1.3. Hyaluronsäure

Ein Hauptbestandteil der EZM ist die Hyaluronsäure (HA), ein unverzweigtes, nicht-sulfatiertes Glykosaminoglykan (GAG). Dieses besteht aus den Monosacchariden D-Glucuronsäure (GlcUA) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc), die β 1,3- und β 1,4-glycosidisch miteinander verknüpft sind (Abbildung 2) [77]. HA kann aus bis zu 10^5 dieser alternierenden Disaccharid-Einheiten bestehen.

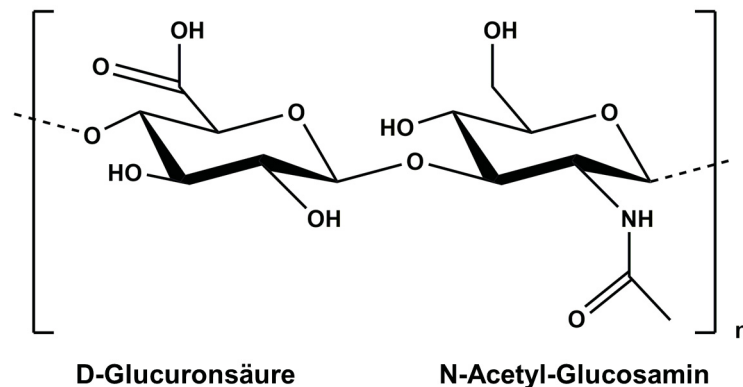


Abbildung 2: Chemische Struktur der Hyaluronsäure.

Gezeigt ist eine glykosidische Bindung zwischen D-Glucuronsäure und N-Acetyl-Glucosamin (nach PubChem CID 24728612).

Durch ihre hydrophilen Eigenschaften, aufgrund der negativen Ladungen, kann HA eine große Menge an Wasser binden, was eine stützende Wirkung auf das Gewebe hat. Dies hat zur Folge, dass ein Milieu geschaffen wird, in dem Zellen gut migrieren und proliferieren können [77]. HA wird direkt in den perizellulären Raum extrudiert. Die Interaktion findet über spezifische Proteine, die sog. Hyaladhärine, statt, wie dem TNF-stimulierten Gen6 Protein (TSG6), CD44, den Rezeptor für HA-vermittelte Motilität (RHAMM), den HA-Rezeptor für Endozytose (HARE), die Toll-ähnlichen Rezeptoren 2 und 4 (TLR2 und TLR4), dem endothelialen Hyaluronsäurerezeptor 1 der Lymphgefäße (LYVE1) und Layilin [77-79]. So können beispielsweise Leukozyten durch die HA rekrutiert werden, indem sie über CD44 an kabelähnliche HA-Strukturen binden [80]. HA wird im Körper sehr schnell umgesetzt und so beträgt die Halbwertszeit in der Haut weniger als ein Tag [81]. Die langkettigen HA-Polymere werden durch die Hyaluronidasen degradiert (EC 3.2.1.35), welche die HA hydrolytisch spalten.

1.3.1. Hyaluronsäuresynthasen

Im Gegensatz zu anderen GAG findet die Synthese der HA an der Plasmamembran statt und von dort erfolgt eine direkte Extrusion der HA in den perizellulären Raum. Der genaue Mechanismus, wie die HA aus der Zelle geschleust wird, wird noch kontrovers diskutiert. Die HA-Synthasen (HAS) vereinen die Funktionen einer Glycosyltransferase

und Translokase [82, 83]. Eine weitere Hypothese besagt, dass die HAS für die Sekretion der HA mit einem ABC-Transporter interagieren [84]. Die Synthese der HAS-Isoformen selbst findet im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Anschließend werden diese über den Golgi-Apparat in die Plasmamembran eingebettet. Aktivierte HAS fügen alternierend GlcUA und GlcNAc an das reduzierende Ende des entstehenden HA-Polymers aus den entsprechenden Uridindiphosphat (UDP)-Vorstufen hinzu [78].

Das Säugetiergenom codiert für drei verschiedene HAS-Isoformen, HAS1, -2, und -3, die trotz ihrer Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. HAS-Isoformen besitzen sieben Membrandomänen sowie eine zytoplasmatische Domäne mit einer Konsensussequenz, die durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden kann [78]. Die Aktivierung der HAS-Isoformen wird durch posttranslationale Modifizierungen, wie Phosphorylierungen und N-Glykosylierungen, aber auch durch Dimerisierungen kontrolliert. Dabei konnten HAS2-Homodimere, aber auch HAS2-HAS3-Heterodimere nachgewiesen werden [85-87].

Die HAS-Isoformen unterscheiden sich in ihrer Lokalisierung und in ihrer Rolle während der Embryonalentwicklung. HAS2-defiziente Mäuse sind aufgrund schwerer vaskulärer und kardialer Fehlbildung embryonal-letal, wobei die Defizienz von HAS1 oder HAS3 keinen Einfluss auf die Fertilität haben [88-90]. Die Überexpression rekombinanter HAS in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) deutet darauf hin, dass sich die von den verschiedenen HAS-Isoformen synthetisierten HA-Polymere in ihrem Molekulargewicht unterscheiden [91]. Dies scheint sich auch auf die katalytische Aktivität der diversen HAS-Isoformen auszuwirken. So weist HAS3 die höchste katalytische Aktivität auf, während diese bei HAS1 am geringsten ist [91].

Die HA-Synthese wird insbesondere in Folge von Verletzungen oder Entzündungen und im Rahmen von Neoplasien hochreguliert. Dies erfolgt über eine veränderte Transkription, eine Stabilisierung der mRNA und posttranslationale Modifikationen. Zytokine, wie der Thrombozyten freigesetzter Wachstumsfaktoren (PDGF), Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 (FGF-2), Keratinozyten Wachstumsfaktor (KGF), Epidermale Wachstumsfaktor (EGF), TGF- β , TNF α und Interleukin-1 β erhöhen die Expression einzelner HAS-Isoformen [86]. Untersuchungen am *HAS2*-Gen ergaben, dass sich in der Promotorregion Bindungsstellen pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren, wie dem *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B) befinden [92]. Die humanen Gene *HAS1* und *HAS3* weisen unterschiedliche Spleißvarianten auf. Im Falle der *HAS1* konnten aberrante Spleißvarianten im Urothelkarzinom oder multiplem Myelom nachgewiesen werden, die über Disulfidbrückenbindungen mit dem

funktionellen HAS1-Protein oligomerisieren und so Einfluss auf dessen Stabilität und Lokalisation nehmen [93-95].

1.3.1.1. 4-Methylumbelliferon

4-Methylumbelliferon (4-MU) ist ein Inhibitor der HA-Synthese. Dabei handelt es sich um ein 7-Hydroxycumarin-Derivat, welches aufgrund seiner choleretischen und krampflösenden Wirkung in vielen Ländern als Arzneistoff mit geringen Nebenwirkungen zugelassen ist.

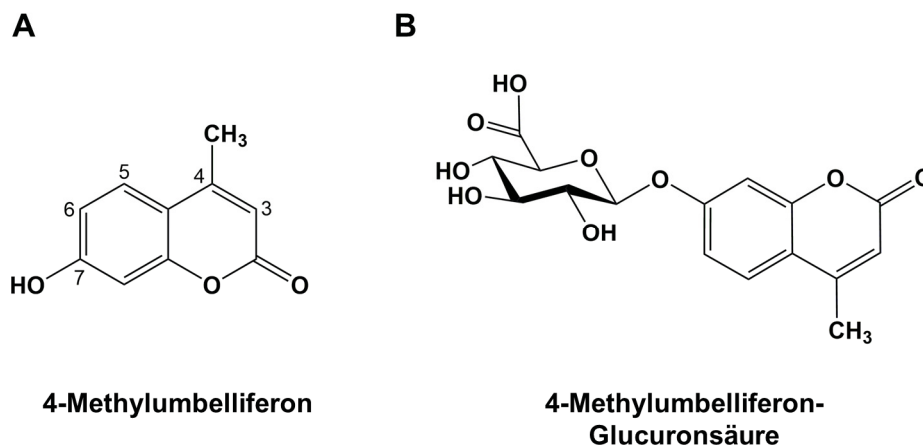


Abbildung 3: Chemische Struktur von A, 4-Methylumbelliferon und B, 4-Methylumbelliferon-Glucuronsäure

A, 4-Methylumbelliferon (nach PubChem CID 5280567), **B**, 4-Methylumbelliferon-Glucuronsäure (nach PubChem CID 5280567 und 94715).

Für die inhibitorische Wirkung auf die HA-Synthese ist die Methylgruppe in Position 3 oder 4 und die Hydroxygruppe in Position 7 essenziell (Abbildung 3A), die durch die Hydroxygruppe in Position 7 verstärkt wird [96]. Die HA-Synthese ist vom zytoplasmatischen UDP-GlcUA-Gehalt abhängig. 4-MU wird durch endogene UDP-Glycosyltransferasen glucuronidiert und reduziert so die im Zytoplasma vorhandene Menge an UDP-GlcUA (Abbildung 3B). Die Inhibition der HA-Synthese wird dadurch begründet, dass das zytoplasmatisch verfügbare UDP-GlcUA nicht mehr für die HA-Synthese zur Verfügung steht, während die restlichen UDP-GlcUA sich überwiegend im Golgi-Apparat befinden und dort zur Synthese anderer GAG eingesetzt werden [97, 98].

Des Weiteren interferiert 4-MU mit der Translokation der HAS in die Plasmamembran [99]. Auch die Expression der Gene *HAS2* und *HAS3* in den Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 ist nach Behandlung mit 4-MU signifikant reduziert [98]. 4-MU nimmt auch Einfluss auf die HA-Signaltransduktion, da die Menge der HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM auf der Zellmembran reduziert wird [100].

1.3.1.2. Einfluss von 4-Methylumbelliferon auf die Tumorprogression

HA ist als eine der Hauptkomponenten der EZM auch ein wichtiger Bestandteil der Mikroumgebung des Tumors. Ösophagus- und Prostatakarzinom-Xenograftmodelle zeigten unter Behandlung mit 4-MU ein reduziertes Tumorwachstum [94, 100, 101]. Ösophaguskarzinomzellen beeinflussen die Sekretion der Chemokine von CAFs. In Kokultur mit der Ösophaguskarzinomzelllinie Kyse 410, die einer Vorbehandlung mit 4-MU unterzogen wurde, zeigen CAFs eine signifikant reduzierte Expression der Chemokine *CCL5* und *CCL11* [102]. In einem Xenograftmodell mit Kyse 410 Zellen führte die Behandlung mit 4-MU unter diabetogenen Bedingungen zu einer deutlichen Reduktion des Tumorwachstums. Hierbei wurde eine reduzierte Proliferationsrate und die Induktion der Apoptose in Tumorzellen nachgewiesen [101]. Ebenfalls konnte unter 4-MU-Behandlung in verschiedenen Modellen ein reduziertes Auftreten von Metastasen beobachtet werden [103, 104].

Neben dem direkten Einfluss auf Wachstum oder Metastasierung der Tumorzellen kann 4-MU auch die Wirksamkeit verschiedener Krebsmedikamente, wie Gemcitabin und Sorafenib steigern [105, 106]. Dabei wird vermutet, dass durch die Reduktion der HA-Matrix die Verfügbarkeit der Wirksubstanzen im Tumor gesteigert wird. Zusätzlich führt in den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 die Behandlung mit 4-MU zu einer Strahlensensitivierung, wodurch die apoptotische Rate nach Applikation von 4-MU und simultaner Bestrahlung mit 2 Gy ionisierender Strahlung erhöht wird [107].

1.3.2. Hyaluronidasen

Bisher sind zwei Mechanismen bekannt, über die HA abgebaut werden kann. Entweder mittels nichtenzymatischer Oxidation oder mit Hilfe einer Klasse von Enzymen, die als Hyaluronidasen bekannt sind. Die nichtenzymatische Oxidation der HA wird durch instabile Moleküle, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder freie Radikale verursacht [108]. Im Vergleich zur enzymatischen Degradation der HA ist der Anteil der nichtenzymatischen Oxidation am HA-Metabolismus gering.

Das humane Genom kodiert für sechs *HYAL*-Gene, von denen alle transkribiert werden. Die Gene *HYAL1*, *HYAL2* und *HYAL3* befinden sich in einem Cluster auf Chromosom 3p21.3, während sich die Gene *HYAL4*, *PHYAL1* und *PH20* auf Chromosom 7q31.3 befinden [109]. In *Vertebrata* sind Hyaluronidasen (EC 3.2.1.35) endo- β -N-Acetyl-Hexosaminidasen, die die Hydrolyse der HA katalysieren [110]. Dabei findet die Spaltung spezifisch an der β 1,4-glykosidischen Bindung statt [78]. Für den Abbau der HA im somatischen Gewebe sind hauptsächlich die Proteine *HYAL1* und -2 verantwortlich.

HYAL2 spaltet hochmolekulare HA (HMW-HA) in 20 kDa große intermediäre Fragmente. Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei 4,0, weshalb anfänglich vermutet wurde, dass HYAL2 ausschließlich im Lysosom aktiv ist [111]. HYAL2 kann aber auch über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden sein und dort mit CD44 und dem Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE1) interagieren. So wird extrazellulär in den sog. *lipid rafts* ein saures Milieu erschaffen, das die Funktion der HYAL2 ermöglicht [112]. Auf diesem Weg entstehende HA-Fragmente werden internalisiert und über frühe Endosomen zu den Lysosomen transportiert, wo sie durch HYAL1 weiter prozessiert werden.

HYAL1 ist ebenfalls extrazellulär, überwiegend in Blutplasma und Urin, und intrazellulär in den Lysosomen lokalisiert. Im Gegensatz zu anderen Hyaluronidasen besitzt es keine GPI-Signalsequenz und ist somit nicht an der Membran gebunden [113]. Das pH-Optimum liegt bei 3,8. Die Spaltung der HA erfolgt zufällig an der β 1,4-glykosidischen Bindung, wobei vorwiegend Tetrasaccharide entstehen [78]. Zellen, wie Hepatozyten, die selbst keine HYAL1 synthetisieren, können diese durch Endozytose in die Lysosomen aufnehmen [114]. Im Lysosom werden die Tetrasaccharide durch Exoglycosidasen, β -Glucuronidasen und β -Hexosaminidasen zu einzelnen Hexose-Molekülen weiterverarbeitet und im Zytosol verschiedenen Stoffwechselwegen zugeführt [78].

1.3.3. Die Rolle der Hyaluronidasen in der Tumorprogression

Während hochmolekulare HA (HMW-HA) in den meisten normalen biologischen Prozessen von Relevanz ist, wurde in den letzten Jahren die Präsenz niedermolekularer HA-Fragmente (LMW-HA) mit einer erhöhten Motilität und Invasion von Tumorzellen in Zusammenhang gebracht.

Der Einfluss der Hyaluronidasen auf Karzinomerkrankungen wurde überwiegend für die Expression von *HYAL1* charakterisiert. Im Urothelkarzinom ist die Expression von *HYAL1* 4-16-fach erhöht und geht mit einer gesteigerten Gefahr der Metastasierung und erhöhten Mortalität der Patienten einher. Im Falle vom Prostatakarzinom besteht bei gesteigerter *HYAL1*-Expression eine zunehmende Wahrscheinlichkeit für Rezidive [115, 116]. Das Vorhandensein von *HYAL1* im Urin gilt als nicht-invasiver Marker in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms [117]. Im Mammakarzinom ist eine erhöhte *HYAL1*-Expression ein Prädiktor für invasives Wachstum [118]. Die Überexpression von *HYAL1* führt zu einer erhöhten Motilität der Tumorzellen und vermittelt das Adhäsion-unabhängige Wachstum, sowie eine gesteigerte Angiogenese [119]. *HYAL1* unterliegt dem alternativen Spleißen. Die dadurch resultierende Spleißvariante *HYAL1-v1* weist

eine um 30 Aminosäuren (AS) verkürzte Aminosäuresequenz auf [120]. *HYAL1-v1* besitzt selbst keine Hyaluronidaseaktivität, wirkt jedoch inhibitorisch auf *HYAL1* durch die Bildung eines katalytisch inaktiven Komplexes [120]. Im Model des Harnblasenkarzinoms konnte gezeigt werden, dass dadurch das Tumorwachstum reduziert und Apoptose induziert werden kann [121].

Untersuchungen bezüglich der Expression von *HYAL2* in Krebserkrankungen ergaben in den letzten Jahren ein uneinheitliches Bild. Während in Melanomen und Mammakarzinomen die Expression von *HYAL2* signifikant erhöht ist, ist die Menge an *HYAL2* mRNA im Endometriumkarzinom reduziert [119, 122, 123]. Des Weiteren korreliert der Verlust der *HYAL2*-Expression im Lungenkarzinom mit einer erhöhten Tumorzinzidenz [124]. Epigenetische Veränderungen von *HYAL2* finden auch Verwendung im Bereich der Tumorfrüherkennung. Das Methylierungsprofil verschiedener Gene, darunter auch *HYAL2*, wird benutzt, um normales Gewebe vom Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (hnSCC) zu differenzieren [125]. Die Spleißvariante *HYAL2ex2-3* wird in Magenkarzinomen im Vergleich zum nicht-transformierten Gewebe vermehrt exprimiert [126].

1.3.4. Degradation der Hyaluronsäure im Tumor

Insbesondere *HYAL1* ist im Tumorgewebe überexprimiert und hat durch die Produktion niedermolekularer HA-Fragmente angiogenetische und anti-apoptotische Eigenschaften. Im Frühstadium des Tumors wird dieser durch ein Geflecht langkettiger HA-Polymere vom Immunsystem abgeschirmt. Des Weiteren können dadurch ein anfängliches Wachstum und eine ausreichende Nährstoffversorgung durch Diffusion gewährleistet werden. Im weiteren Verlauf des Wachstums wechselt der Tumor vom avaskulären in einen vaskulären Zustand. Der anaerobe Stoffwechsel und das hypoxische und inflammatorische Milieu führen zu einer Senkung des extrazellulären pHs bis zu einem Wert von 5,6 [127]. Diese azidotische Lokalreaktion führt zu einer erhöhten Aktivität der extrazellulären Hyaluronidasen und in Folge zu einer gesteigerten Degradation der HA-Matrix [112].

HA-Fragmente im niedermolekularen Bereich, bestehend aus 4 – 25 Disacchariden, führen zu einer gesteigerten Angiogenese durch Stimulation der Proliferation, Migration, Invasion und Tubulusformation endothelialer Zellen [128-130]. Des Weiteren wird durch LMW-HA das Immunsystem moduliert. Beispielsweise wird durch LMW-HA die Reifung, Aktivierung und Infiltration dendritischer Zellen reguliert, die wiederum tumorfördernde Zytokine sezernieren [131]. In *in vitro* Studien konnte die exogene Zugabe von LMW-HA

einen anti-apoptischen Effekt hervorrufen, der durch die Induktion des Hitzeschock-Protein (HSP) 72 zu erklären ist [132].

1.3.5. Ascorbinsäurepalmitat

Aufgrund der tumorfördernden Eigenschaften der Hyaluronidasen stellen diese einen vielversprechenden Ansatz einer zielgerichteten Therapie dar. Verschiedene Substanzen wurden bezüglich ihrer inhibitorischen Eigenschaften auf die Hyaluronidase-Aktivität getestet. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft wurden GAGs wie Heparin, Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, aber auch sulfonierte HA strukturell charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Inhibition mit dem Grad der Sulfonierung korreliert [133].

Untersuchungen mit *Streptococcus pneumoniae* zeigten, dass L-Ascorbinsäure (Vitamin C; Vc, Abbildung 4A) die von diesem Organismus exprimierte Hyaluronatlyase geringfügig inhibiert [134]. Durch die Bindung des Moleküls an das aktive Zentrum der Hyaluronatlyase kommt es zu einer kompetitiven Hemmung.

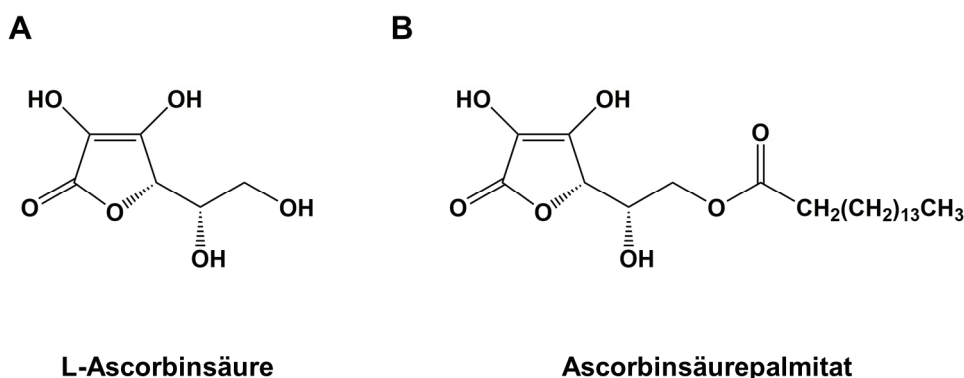


Abbildung 4: Chemische Struktur von A, L-Ascorbinsäure und B, Ascorbinsäurepalmitat
A, L-Ascorbinsäure (nach PubChem CID 54670067), **B**, Ascorbinsäurepalmitat (nach PubChem CID 54680660).

Dieser Effekt wird durch zusätzliche hydrophobe Interaktionen verstärkt. Ascorbinsäurepalmitat (Vcpal, Abbildung 4B) ist ein Ester bestehend aus dem Alkohol L-Ascorbinsäure und der Säure Palmitinsäure. Dieser Ester besitzt eine starke inhibitorische Wirkung sowohl auf die *bovine* Hyaluronidase (BTH), als auch auf die Hyaluronatlyase der Streptokokken [135]. Dabei wurden IC₅₀-Werte von 4 µM in Bezug auf die bakterielle Hyaluronatlyase, bzw. 56 µM für die BTH festgestellt.

Der Einsatz von Vcpal ist gesundheitlich unbedenklich, da Vcpal als Nahrungsergänzungsmittel gemäß der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuIV) mit der Nummer E304 zugelassen [136].

1.4. Ziele der Arbeit

Für die Tumorprogression und Metastasierung ist das Mikromilieu von großer Bedeutung. Wichtige Bestandteile des Mikromilieus sind zum einen die HA-Matrix, als ein Hauptbestandteil der EZM, und zum anderen MSCs, als wichtige Vertreter der Stromalen Zellpopulation.

Vorangegangene Untersuchungen in unserem Labor ergaben, dass in kutanen Plattenepithelkarzinomen die HA-assoziierten Gene *HAS3*, *HYAL1* und *HYAL2* im Vergleich zur gesunden Haut stark überexprimiert sind. Insbesondere die Überexpression von *HYAL1* wird mit einer schlechten Prognose diverser Tumorentitäten in Verbindung gebracht [115, 116]. Daher soll im ersten Teil dieser Arbeit die Rolle der HA-Matrix auf die Progression kutaner Plattenepithelkarzinomen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Im zweiten Teil soll die Interaktion zwischen Tumorzellen und MSCs untersucht werden und wie diese durch die HA-Matrix beeinflusst wird. MSCs sind wichtiger Bestandteil des Tumor-Mikromilieus und können aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften die pre-metastatische Nische modulieren und direkten Einfluss auf die Tumorzellen nehmen. Dabei wird ein besonderer Fokus auf die Fragestellung gelegt, warum verschiedene Tumorentitäten sich im metastatischen Potential unterscheiden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien und Zellkultur Materialien

Tabelle 1: Liste der untersuchten Zelllinien

| Bezeichnung | Beschreibung | Kultivierungsmedium | Lieferant |
|-------------|--|--|-----------------------|
| NHDF | Normale, humane, dermale Fibroblasten | DMEM + 4,5g/l Glukose + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin-Streptomycin | PromoCell, Heidelberg |
| NHEK | Normale, humane, epidermale Keratinozyten | KGM2 + KGM SupplementMix (Promocell) + 0,06 mM CaCl ₂ | Promocell, Heidelberg |
| A431 | Humane Plattenepithelkarzinome aus der Haut | DMEM + 4,5g/l Glukose + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin-Streptomycin | ECACC, Porton Down |
| MCF-7 | Humane, epitheliale Mamma-Karzinomzellen | DMEM + 4,5g/l Glukose + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin-Streptomycin | CLS, Eppelheim |
| MDA-MB-231 | Humane, mesenchymale Mamma-Adenokarzinomzellen | DMEM + 4,5g/l Glukose + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin-Streptomycin | CLS, Eppelheim |
| U87-MG | Humane Glioblastoma multiforme Zelllinie | DMEM + 4,5g/l Glukose + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin-Streptomycin | ECACC, Porton Down |

Tabelle 2: Liste der untersuchten Primärzellen

| Zelltyp | Kultivierungsmedium | Lieferant |
|--------------------------------|--|--|
| CD3 ⁺ T-Lymphozyten | RPMI + 10% FCS + 1% L-Glutamin + 100 U/ml Penicillin-Streptomycin | GMP-Anlage der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf |
| Mesenchymale Stammzellen (MSC) | DMEM + 1g/l Glukose + 5% Plättchenlysate/Heparin + 5% gefrorenes Frischplasma + 1% L-Glutamin + 100 U/ml Penicillin-Streptomycin | GMP-Anlage der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf |

Tabelle 3: Verwendete Basismedien

| Medium | Bezeichnung | Hersteller |
|---|-------------|-----------------------------------|
| Keratinocyte Growth Medium 2 | KGM2 | PromoCell, Heidelberg |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium | DMEM | Thermo Fisher Scientific, Waltham |
| Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium | RPMI 1640 | Thermo Fisher Scientific, Waltham |

2.1.2. Antikörper

Tabelle 4: Auflistung und Verwendung der in dieser Arbeit verwendeten Erstantikörper

| Antikörper | Verwendung | Verdünnung | Wirt | Katalog-Nr. | Hersteller |
|-------------------|------------|------------|-----------|-------------|--------------------------------------|
| PARP [46D11] | WB | 1:1.000 | Kaninchen | #9532 | Cell Signaling Technologies, Danvers |
| pTAK1 (Ser412) | WB | 1:1.000 | Kaninchen | #9339 | Cell Signaling Technologies, Danvers |
| pTAK1 (Ser412) | IHC | 1:200 | Kaninchen | bs-3435R | BIOSS Antibodies, Boston |
| TAK1 (D94D7) | WB | 1:1.000 | Kaninchen | #5206 | Cell Signaling Technologies, Danvers |
| Hyal1 | WB | 1:500 | Kaninchen | HPA002122 | Sigma-Aldrich, St. Louis |
| Hyal1 | IHC | 1:50 | Kaninchen | ab203293 | Abcam, Cambridge |
| pERK | WB | 1:1.000 | Kaninchen | #9101 | Cell Signaling Technologies, Danvers |
| ERK | WB | 1:1.000 | Kaninchen | #9102 | Cell Signaling Technologies, Danvers |
| β-Aktin | WB | 1:10.000 | Maus | A5316 | Sigma-Aldrich, St. Louis |
| β-Tubulin | WB | 1:10.000 | Maus | T7816 | Sigma-Aldrich, St. Louis |

Tabelle 5: Auflistung und Verwendung der in dieser Arbeit verwendeten Zweitantikörper

| Antikörper | Anwendung | Verdünnung | Wirt | Katalog-Nr. | Hersteller |
|-------------------------------------|-----------|------------|-------|-------------|-------------------------------|
| IRDye® 800CW anti- mouse IgM | WB | 1:10.000 | Ziege | 925-32280 | LI-COR, Lincoln |
| IRDye® 800CW anti- rabbit IgG | WB | 1:10.000 | Ziege | 926-32211 | LI-COR, Lincoln |
| IRDye® 680LT anti- mouse IgM | WB | 1:10.000 | Ziege | 926-68080 | LI-COR, Lincoln |
| IRDye® 680LT anti- mouse IgG | WB | 1:10.000 | Ziege | 926-68071 | LI-COR, Lincoln |
| goat anti- rabbit IgG- HRP | IHC | 1:100-200 | Ziege | sc-2004 | Santa Cruz Technology, Dallas |

2.1.3. Inhibitoren und Stimulantien

Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren und Stimulantien

| Substanz | Verwendung | Endkonzentration | Katalog-Nr. | Hersteller |
|----------------------------------|--|--------------------------|-------------|----------------------------|
| 4-Methylumbelliferon (4-MU) | HAS-Inhibitor (Kultti <i>et al.</i> , 2009) | 100 & 300 μ M | M1508 | Sigma-Aldrich, St. Louis |
| Bafilomycin A1 (B A1) | Inhibitor der vakuolaren H ⁺ -ATPase (Yoshimori <i>et al.</i> , 1991) | 10 nM | 196000 | Calbiochem, San Diego |
| Ascorbinsäure 6-palmitat (Vcpal) | Inhibitor der Hyaluronidasen (Botzki <i>et al.</i> , 2004) | 125 & 250 μ M | 76183 | Sigma-Aldrich, St. Louis |
| (5Z)-7-Oxo-zeaenol | Inhibitor der MAP-Kinase TAK1 (Rawlins <i>et al.</i> , 1999) | 1 & 5 μ M | 17459 | Cayman Chemical, Ann Arbor |
| CLI-095 | Inhibitor des TLR4 (Li <i>et al.</i> , 2006) | 5 & 10 μ M | tlr1-cli95 | InvivoGen, San Diego |
| TGF- β 1 | Aktivierung von TAK1 (Kim <i>et al.</i> , 2009) | 10 ng/ml | 100-21 | PeproTech, Rocky Hill |
| Dexamethason | Adipogene/ osteogene Differenzierung | 1 μ M & 0,01 μ M | D1756 | Sigma-Aldrich, St. Louis |
| Indometacin | Adipogene Differenzierung | 200 μ M | I7378 | Sigma-Aldrich, St. Louis |
| Insulin | Adipogene Differenzierung | 100 μ g/ml | I9275 | Sigma-Aldrich, St. Louis |
| β -Glycerolphosphat | Osteogene Differenzierung | 10 mM | G9422 | Sigma-Aldrich, St. Louis |
| Ascorbinsäure | Osteogene Differenzierung | 50 μ M | A8960 | Sigma-Aldrich, St. Louis |

2.1.4. Puffer

Tabelle 7: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer

| Puffer | Zusammensetzung |
|---|--|
| Blotpuffer | 14,4 g Glycin, 3 g TRIS ad 800 ml H ₂ O + 20% V/V Methanol p.a. |
| Laufpuffer | 14,4 g Glycin, 3 g TRIS, 1 g SDS ad 1.000 ml H ₂ O |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) | 0,2 g KCl, 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 8 g NaCl, 1,15 g Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4 ad 1.000 dH ₂ O |
| TRIS-gepufferte Salzlösung (TBS) | 1,21 g TRIS, 8,76 g NaCl ad 1.000 ml H ₂ O |
| TBS-T | TBS Puffer + 0,1% Tween [®] 20 |
| Radioimmunopräzipitations Assay Puffer (RIPA) | 150 mM NaCl, 50 mM TRIS pH 8,0, 1% Triton X-100, 0,5% Na-Desoxycholat, 0,1% SDS |
| 2x Laemmli Puffer | 125 mM TRIS, 20% Glycerin, 4% SDS, 0,004% Bromphenolblau, pH 6,8 (10% β - Mercaptoethanol vor Verwendung hinzugeben) |
| Citratpuffer | 0,1% Natriumcitrat-Dihydrat, 0,1% Triton X-100 in ddH ₂ O |

2.1.5. Primer

Tabelle 8: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer für die qRT-PCR

| Gen | Vorwärtsprimer (5'→3') | Rückwärtsprimer (5'→3') |
|------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| GAPDH | GTGAAGGTCGGAGTCAACG | TGAGGTCAATGAAGGGGTC |
| 18S | GCAATTATTCCCATGAACG | GGCCTCACTAAACCATCCAA |
| HYAL1 (Var. 2,3,5,7 & 8) | CCAAGGAATCATGTCAGGCCATCAA | CCCCTGGTACGTTTCAGG |
| HYAL2 | TTCACACGACCCACCTACAG | GTCTCCGTGCTTGTGGTGTA |
| HAS1 | TACAACCAGAAGTTCCTGGG | CTGGAGGTGTACTTGGTAGC |
| HAS2 | GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA | TCCAACCATGGGATCTTCTT |
| HAS3 (Var.1) | CCTTCCCCTACCCAGAGC | GAAGTGGTAGCCCGTACAT |
| PDL1 | CAAGGCCGAAGTCATCTGGA | GGAATTGGTGGTGGTGGTCT |
| BIRC2 (ciAP1) | TGCGGCCAACATCTTCAAAAA | TCCAGTGACAGACCTGAAACAT C |
| BIRC3 (ciAP2) | TGCTGTGATGGTGGACTCAG | ACTCACACCTTGAAACCACT |
| XIAP | CAGAGCGGAGTTGGCATTTC | TCACCTTTTCGCGCCAG |
| COL3A1 | AACACGCAAGGCTGTGAGACT | GCCAACGTCCACACCAAATT |
| COL1A1 | GGAGCAAGTGGTGAACGTG | CTCGTCCAGGGGAACCTT |
| MMP2 | GCTCAGATCCGTGGTGGAGAT | GGTGCTGGCTGAGTAGATCC |
| MMP9 | TCTTCCCTGGAGACCTGAGA | ATTCGACTCTCCACGCATC |
| HSPG2 | TGAGTCCTTCTACTGGCAGC | GTTGTTGCCCGTGATCTGC |
| DEC (Var.1 & 2) | TCTTCCCCTGACACAATC | TGCTCCAGGACTAACTTTGCT |
| CSPG4 | CACGGATGCCACCCTACAAG | TCCTGGGCTGCCTCCAG |
| CHST1 | TCCTAGCTTTGGGAGGACA | CAGTGTTGAGGGTGACAAGAGT |
| FN1 | TGGGCAACTCTGTCAACGAA | CCACTCATCTCCAACGGCAT |
| MMP14 | GAGCATTCCAGTGACCCCTC | ACCCTGACTCACCCCATAA |
| COL2A1 (Var.1) | CCGTTTCGCTGCGCTC | GCCAGCCTCCTGGACATC |
| COL5A1 (Var.1) | GACAAGAAGTCCGAAGGGGC | TAGGAGAGCAGTTTCCCACG |
| COL6A1 | TAAAGGCTACCGAGGCGATG | GCCGTCTTCTCCCCTTTTAC |
| DSE | CCCAGCATGTAGGAGCAGTT | TTCGAAAGATCCTTCCTGCCTC |
| COL4A1 (Var. 1) | GGCTCAGCGTCTGGCTG | CCAGCACAGCCACCCTTC |
| COL8A1 | ATCACAGCCCTTCCCGAT | AACGTGTGAGCTCCCTTGAG |
| COL9A1 (Var.1) | GGGTAACAGTGAAGGGGTCG | TGGAATTTTCCAGCAGGTCTTCA |
| COL10A1 | GAAGCTTCAGAAAGCTGCCAA | CATATTCTCAGATGGATTCTGCG TG |
| COL12A1 | GGCAAGGCTATCCAGGTTCC | TAAGCACGTGCGCAAACATC |
| COL11A1 (Var.1) | AGGCTGAAAGTGTAACAGAGGG | CAACGATGTTTGCCTCCGTC |
| COL13A1 (Var.1) | GAGAAAAGGGTCAGTGTGGAGA | GAGCCAGTCGCACTGAATTG |
| COL14A1 | ACTCCGAGGGAAGAGAGCAA | TGTAGCAGCCACCTGTGC |
| COL17A1 | CAGGACCTGTCACCACCATC | CGTACCCCGAAGTCCGTAAG |
| CD44 | GCTATTGAAAGCCTTGCAGAG | CGCAGATCGATTTGAATATAACC |
| RHAMM | GAATTTGAGAATTCTAAGCTTG | CCATCATACCCCTCATCTTTGTT |
| LAYILIN | ATCCTAATCCCAGCATTCC | GGTGTGTTGCTTCTTTGTGC |
| LYVE | ACTTCCATCTGGACCACGAG | ATGACACCTGGATGGAAAGC |

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ bei humider Atmosphäre im entsprechenden Medium kultiviert. Für das Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und im Anschluss mit einer 0,5 %igen Trypsin/EDTA-Lösung (TE, Thermo Fisher Scientific, Waltham) abgelöst. Nachdem die Zellen abgelöst waren, wurden diese bei 300 g für 5 min zentrifugiert und das Pellet im entsprechenden Medium resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Kammer wurden die Zellen in einer Dichte von 12.500 Zellen/cm² ausgesät.

2.2.2. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden bei 300 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl des für die Zellen entsprechenden Mediums resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 1:1 mit 0,4 % Trypanblau (ThermoFisher Scientific, Waltham) verdünnt und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Auswertung von vier Großquadraten wurde das Ergebnis mit dem Faktor 10⁴ multipliziert, was der Zellzahl/ml entsprach.

2.2.3. Stimulierung von Zellen

Die Zellen wurden in einer Dichte von 12.500 Zellen/cm² in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l Glukose und Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) sowie die Zugabe von 1 % Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham) ausgesät. Um die Zellen bezüglich der Zellzyklusphase zu synchronisieren, wurde das Medium nach 24 h durch DMEM ohne FCS ersetzt. Nach Ablauf weiterer 24 h wurden die Zellen stimuliert und 48 h *post* Stimulation analysiert.

2.2.4. Herstellung von Überständen

Die Zellen wurden in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² in T75 Flaschen in 12 ml des entsprechenden Mediums ausgesät und für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abgenommen und mittels eines Spritzenvorsatzfilters Filtropur S mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert (Sarstedt, Nümbrecht). Der Überstand wurde jeweils für die direkte Nutzung generiert.

2.2.5. Transfektion

Um die Expression bestimmter Gene zu reduzieren, wurden kurze interferierende RNAs (siRNA) in die Zellen mittels Lipofectamin[®] RNAiMAX (Life Technologies, Carlsbad) eingebracht. In einer Lochung einer Mehrlochplatte wurde 1 µl der siRNA (Ausgangskonzentration 10 µM) in 100 µl DMEM ohne FCS und Penicillin-Streptomycin

gegeben. Parallel dazu wurden 2 µl Lipofectamin® ebenfalls in 100 µl DMEM ohne FCS und Penicillin-Streptomycin bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert.

Tabelle 9: Für die Transfektion verwendete siRNAs

| mRNA | siRNA | Hersteller |
|-------------|---------------------------------|----------------|
| siKontrolle | AllStars Negative Control siRNA | Qiagen, Hilden |
| HAS3 | Hs_HAS3_3 FlexiTube siRNA | Qiagen, Hilden |
| HYAL1 | Hs_HYAL1_6 FlexiTube siRNA | Qiagen, Hilden |
| HYAL2 | Hs_HYAL2_1 FlexiTube siRNA | Qiagen, Hilden |

Zur Ausbildung der Lipofectamin®-siRNA Komplexe wurde der Lipofectamin® Mix direkt in die Lochung mit der siRNA gegeben und für weitere 20 min inkubiert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 12.500 Zellen/cm² in 800 µl Medium hinzugegeben, sodass sich ein finales Volumen von 1 ml mit einer Endkonzentration der siRNA von 10 nM ergab. Nach 24 h wurden die Zellen mit 110 µl FCS stimuliert. Die Transfektionseffizienz wurde nach 96 h mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) überprüft und als ausreichend befunden, sobald die Expression des Zielgens um mindestens 50 % reduziert war.

2.2.6. Bestimmung der Proliferationsrate

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden die Zellen mit 5(6)-Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidylester (CFSE; Life Technologies, Carlsbad) nach Quah *et al.* (2007)[137] gefärbt. Intrazelluläre Esterasen wandeln dabei CFSE in ein fluoreszierendes Molekül um, welches über stabile Amidbindungen an zytoplasmatische Proteine bindet und in der Zelle verweilt. Nach jeder Zellteilung wird der fluoreszierende Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt (Deleyrolle *et al.* 2012). Für die Färbung werden 1x10⁶ Zellen in 1 ml PBS mit 0,1 % FCS und einer Endkonzentration von 10 µM CFSE für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe des 5-fachen Volumens von DMEM mit 10% FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin gestoppt. Anschließend wurden die Zellen bei 300 g für 5 min zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und in einer Dichte von 12.500 Zellen/cm² ausgesät. Für die Auswertung wurden die Zellen trypsiniert und mit Hilfe des Durchflusszytometers EasyCyte 5 (Millipore, Billerica) das gemittelte Fluoreszenzsignal im grünen Kanal (525/30 nm) gemessen. Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgte reziprok.

2.2.7. Quantifizierung der sezernierten Hyaluronsäure im Überstand

Zur Quantifizierung der HA im Überstand wurde das *Hyaluronic Acid Test Kit* (Corgenix, Colorado) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dabei handelt es sich um einen ELISA-artigen, immunturbidimetrischen Assay. Die HA im Überstand bindet auf speziell mit HA-Bindeprotein (HABP) präparierten Latexpartikel in einer 96-Loch Multititerplatte. Die Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 800 nm, wobei der Grad

der Trübung proportional zum HA-Gehalt war. Zur Normalisierung wurden die Zellen in 0,1 M Natriumhydroxid für 15 min bei Raumtemperatur lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Quantifizierung der HA wurde freundlicherweise von Irmhild Rüter übernommen.

2.2.8. Adipogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen mit anschließender Öl Rot O Färbung

MSCs wurden in einer Dichte von 16.000 Zellen/Lochung in einer 24-Loch-Multititerplatte ausgesät. Das dafür verwendete Kultivierungsmedium (s. Tabelle 2) wurde zur Entfernung der Thrombozyten im Plättchenlysat filtriert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreicht hatten, wurde mit der Stimulation begonnen. Dafür wurde das Medium durch DMEM + 1 g/l Glukose + 10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin ersetzt und mit den folgenden Stimulantien versetzt (Tabelle 10):

Tabelle 10: Substanzen für die adipogene Differenzierung

| Substanz | Ausgangskonzentration | Endkonzentration |
|---------------|-----------------------|------------------|
| Dexamethason | 10 mM | 0,001 mM |
| Insulin | 10 mg/ml | 100 µg/ml |
| Indomethacine | 20 mM | 0,2 mM |

Das Medium wurde über einen Zeitraum von 28 d zweimal wöchentlich gewechselt.

Im Anschluss wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 4 % PFA für 15 min fixiert und mittels einer 0,2 %igen Öl Rot O-Lösung gefärbt. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde eine 0,3 %ige Ausgangslösung (300 mg Öl Rot O in 100 ml 2-Propanol p.a.) mit 2-Propanol p.a. im Verhältnis 3:2 verdünnt. Die Zellen wurden in 60 % 2-Propanol (VWR, Radnor) gewaschen und für 10 min mit der Öl Rot O-Arbeitslösung inkubiert. Danach wurde die Arbeitslösung entnommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Um bei der anschließenden Quantifizierung auf die Zellzahl zu normieren, wurden die Zellen für 5 min mit Hoechst 33342 (Invotrigen, Carlsbad) in einer Verdünnung 1:1.000 inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte durch mikroskopische Aufnahmen am Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen) im Cy3-Kanal. Für die Auswertung der Bilder wurde die freiverfügbare Software FIJI verwendet. Der Grad der Differenzierung wurde anhand des Faktors

$$\frac{\% \text{ Anteil roter Färbung am Gesamtbild}}{\text{Anzahl der Kerne}}$$

ermittelt.

2.2.9. Osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen mit anschließender Alizarin S Färbung

Für die osteogene Differenzierung von MSCs wurden diese wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben ausgesät. Die dafür benötigten Stimulantien sind der nachfolgenden Tabelle 11 zu entnehmen:

Tabelle 11: Substanzen für die osteogene Differenzierung

| Substanz | Ausgangskonzentration | Endkonzentration |
|---------------------------|-----------------------|------------------|
| Dexamethason | 10 μ M | 0,01 μ M |
| L-Ascorbinsäure | 50 mM | 0,05 mM |
| β -Glycerolphosphat | 1 M | 0,01 M |

Das Medium wurde über einen Zeitraum von 28 d zweimal wöchentlich gewechselt.

Die bei der osteogenen Differenzierung auf der Zelloberfläche abgelagerten Calciumphosphate wurden mittels Alizarin S gefärbt. Dazu wurden die Zellen mit 4 % PFA für 15 min fixiert und mit demineralisiertem H₂O gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2 % Alizarin S-Lösung (pH 4,0) für 10 min inkubiert und mehrmals gespült und in PBS gelagert.

2.2.10. Quantifizierung der osteogenen Differenzierung mittels Bestimmung der Calcium-Konzentration

Die in einer 24-Loch-Multititerplatte ausgesäten Zellen wurden wie im Abschnitt 2.2.9 differenziert. Nach der Differenzierung wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und in 50 μ l 100 mM Tris/HCl + 1 % Triton X-100 lysiert.

Die Ca²⁺-Konzentration wurde mit Hilfe eines *Calcium Assay Kits* (Abnova, Taipeh) gemäß den Herstellerangaben gemessen. Die Absorption wurde mit einem *Microplate Reader Synergie™ Mx* (BioTek, Winooski) bei einer Wellenlänge von 612 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden auf die Proteinkonzentration normalisiert.

2.2.11. T-Zell-Proliferations-Analyse zur Ermittlung des immunsuppressiven Potential von MSCs

MSCs wurden in einer Dichte von 20.000 Zellen/Lochung einer 96-Loch Multititerplatte in DMEM + 1g/l Glukose und 10 % FCS ausgesät.

24 h später wurden die T-Zellen in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und mit RPMI gewaschen. Danach wurden die Zellen bei 400 g für 5 min zentrifugiert und das Pellet erneut in 10 ml RPMI resuspendiert und die T-Zellen bei 37 °C in einem Wasserbad für 30 min inkubiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen erneut zentrifugiert.

Das Pellet wurde diesmal in 2 ml PBS resuspendiert und mit 2 µl CFSE in einer Konzentration von 0,5 mM versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C wurde die Färbung durch die Zugabe von 10 ml RPMI gestoppt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml RPMI aufgenommen und für 30 min bei 37 °C inkubiert, damit sich die Zellen von der Färbung regenerieren konnten. Die benötigte Menge an T-Zellen wurde im Anschluss in einem 50 ml Falcon-Röhrchen im Pellet aktiviert. Dazu wurden auf 2.000.000 Zellen 4 µl des Antikörpers gegen humanes CD28 (BD Pharmingen™, Franklin Lakes) und 8 µl des Antikörpers gegen humanes CD3 (BD Pharmingen™, Franklin Lakes) gegeben und für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in der entsprechenden Menge RPMI resuspendiert, sodass eine Suspension mit einer Zellkonzentration von 500.000 Zellen/ml entstand, und jeweils 200 µl in eine Lochung der 96-Loch Multititerplatte gegeben. Nach 6 d wurden die Zellen von Dr. Özer Degistirici und Silke Stuhlsatz mit einem Durchflusszytometer bezüglich der proliferativen Rate analysiert mit Hilfe des FACSCaliburs (BD Biosciences, Franklin Lakes).

2.2.12. Zeitraffer-Mikroskopie zur Bestimmung der Motilität

Die Motilität kultivierter Zellen wurde mittels Zeitraffer-Mikroskopie bestimmt. Dafür wurden die Zellen entweder wie in Abschnitt 2.2.3 behandelt und 24 h nach Stimulation oder 24 h nach Etablierung einer Kokultur untersucht.

Die akkumulierte Distanz wurde mit Hilfe des *Manual tracking plug-ins* der *Software FIJI* bestimmt und die so erhaltenen Datenpunkte mit der *Software Chemotaxis and Migration Tool* (Ibidi, Martinsried) ausgewertet.

2.2.13. Nicoletti Untersuchung zur Bestimmung der apoptotischen Fraktion

Zur Bestimmung der Apoptose wurde die internukleosomale DNA-Fragmentierung nach Nicoletti *et al.* (1991)[138] bestimmt. Dazu wurden der Überstand der Zellen gesammelt und diese mit 1 ml PBS gewaschen. Dieses wurde ebenfalls gesammelt und die Zellen im Anschluss trypsinisiert. Nach Neutralisierung der Trypsinierung (s. Abschnitt 2.2.1) wurden die Zellen in das gleiche Gefäß wie die entsprechenden Überstände überführt. Die Zellen wurden bei 300 g zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 75 µl Lysepuffer resuspendiert. Durch die Zugabe von 25 µl Guava® *Cell Cycle Reagent* (Millipore, Billerica, MA, USA) wurde die internukleosomale DNA durch das darin befindliche Propidiumiodid (PI) markiert. Die Auswertung erfolgte durch das Durchflusszytometer EasyCyte 5 (Millipore, Billerica) im roten Kanal (690/50 nm).

2.2.14. Immunzytochemische Färbung

Die Zellen wurden auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 18 mm ausgesät. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 min in einer 1:1.000 Hoechst 33342 (Invitrogen, Carlsbad) Lösung inkubiert. Mit 4 % PFA wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 20 min fixiert. Zur Detektion der Hyaluronsäure wurden die Zellen in einem sauren Milieu fixiert um die kabelähnlichen Strukturen der Hyaluronsäure zu bewahren. Dazu wurde PBS mit 4 % PFA, 70 % EtOH und 0,5 % Essigsäure verwendet. Zur Färbung intrazellulärer Proteine wurden die Zellen mit 0,3 % Triton X-100 in PBS mit 5 % BSA permeabilisiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch PBS mit 5 % BSA. Die Zellen wurden mit dem Erstantikörper über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, wurden diese mit dem Zweitantikörper bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Schließlich wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS mit ProLong® Gold (Invitrogen, Karlsruhe) invertiert auf einem Objektträger eingedeckt. Die Mikroskopie erfolgte mittels einem Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen).

2.2.15. Färbung der Lysosomen lebender Zellen

Zum Endpunkt der Analyse wurden die Zellen mit auf 37 °C temperierten PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C mit LysoTracker® Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific, Waltham) mit einer Endkonzentration von 50 nM in serumfreien Medium inkubiert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, wurden diese mit 4 % PFA für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Kernfärbung und das Eindecken der Zellen erfolgte wie im Kapitel 2.2.14 beschrieben. Die Proben wurden sofort nach der Färbung mit einem Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen) mikroskopiert.

2.2.16. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Reaktion

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bicinchoninsäure (BCA) nach Smith *et al.* (1985)[139] unter Zuhilfenahme des Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham) bestimmt. Dafür wurden die Zellen in Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA) Puffer lysiert. Eine Standardreihe aus *bovinem* Serumalbumin (BSA; 2 mg/ml) wurde entsprechend der Tabelle 12 hergestellt.

Tabelle 12: Präparation der BSA Standardreihe

| Gefäß | Volumen Verdünnungsmittel (µl) | Volumen und Quelle BSA (µl) | BSA Endkonzentration (µg/ml) |
|-------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|-------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|

| | | | |
|---|-----|----------------|-------|
| A | 0 | 300 (Standard) | 2.000 |
| B | 125 | 375 (Standard) | 1.500 |
| C | 325 | 325 (Standard) | 1.000 |
| D | 175 | 175 (Gefäß B) | 750 |
| E | 325 | 325 (Gefäß C) | 500 |
| F | 325 | 325 (Gefäß E) | 250 |
| G | 325 | 325 (Gefäß F) | 125 |
| H | 400 | 100 (Gefäß G) | 25 |
| I | 400 | 0 | 0 |

Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden die dem Kit beiliegendem Reagenzien A und B in einem Verhältnis 50:1 vermischt. Die Messung erfolgte in einer Mikrotiterplatte mit 96 Lochungen. Es wurden 200 µl der Arbeitslösung auf 25 µl des Lysats bzw. des BSA-Standard gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde im Anschluss für 30 min bei 37 °C inkubiert und mit Hilfe eines *Microplate Reader Synergie™ Mx* (BioTek, Winooski) die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

2.2.17. Immunoblot

Die Zellen wurden mit kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen und auf Eis mit RIPA-Puffer mit Proteinase- und Phosphatase-Inhibitor-Mix lysiert. Die Proteinkonzentration wurde wie im Abschnitt 2.2.16 bestimmt und das Lysat mit 5-fach Laemmli-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 95 °C erhitzt.

Die Proteine wurden mit Hilfe einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) nach aufgetrennt. Für das Sammelgel wurde ein 5% Polyacrylamid-Gel verwendet, während die Konzentration des Trenngels bezüglich des molekularen Gewichts des zu detektierenden Proteins zwischen 8 und 15 % variierte.

Tabelle 13: Zusammensetzung eines Sammelgels (5%)

| | |
|-------------------------|----------|
| H ₂ O | 3,263 ml |
| 40% Acrylamid | 0,563 ml |
| 1,0 M TRIS/HCl (pH 6,5) | 0,563 ml |
| 10% SDS w/v | 0,045 ml |
| 10% APS w/v | 0,045 ml |
| TEMED | 0,005 ml |

Tabelle 14: Zusammensetzung der Trenngelle verschiedener Konzentrationen

| | 8% | 10% | 12% | 15% |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|
| H ₂ O | 3,970 ml | 3,600 ml | 3,220 ml | 2,658 ml |
| 40% Acrylamid | 1,500 ml | 1,875 ml | 2,250 ml | 2,813 ml |
| 1,5 M TRIS/HCl (pH 8,8) | 1,875 ml | 1,875 ml | 1,875 ml | 1,875 ml |
| 10% SDS w/v | 0,075 ml | 0,075 ml | 0,075 ml | 0,075 ml |

| | | | | |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|
| 10% APS w/v | 0,075 ml | 0,075 ml | 0,075 ml | 0,075 ml |
| TEMED | 0,005 ml | 0,005 ml | 0,005 ml | 0,005 ml |

Die Gele wurden mit 5 µg Protein beladen und mittels Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BIO-RAD, Hercules), die mit Laufpuffer befüllt wurde, getrennt. Die Auftrennung erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 120 V. Anschließend wurden die Proteine durch die *semidry*-Technik bei einer konstanten elektrischen Spannung von 14 V für 1 h auf eine Nitrocellulosemembran Amersham™ Protran™ 0,2 µm NC (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles) übertragen. Im Anschluss wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5 % BSA in TBS-T für mindestens 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C ebenfalls in 5% BSA in TBS-T. Danach wurden die Membranen dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h in TBS-T. Die Antikörperkonzentrationen sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die im Infrarot-Spektrum fluoreszierenden Zweitantikörper wurden mit einem Odyssey CLx *Infrared Imaging System* (LI-COR, Lincoln) detektiert. Für die bildliche Darstellung und Quantifizierung wurde die *Software Image Studio 3.0* (LI-COR, Lincoln) verwendet.

2.2.18. Signaltransduktionsanalyse

Die Zellen wurden mit dem *PathScan® Sandwich ELISA Lysis buffer* (Cell Signal Technology, Danvers) lysiert. Der Grad der Expression und der Phosphorylierung wurde mit Hilfe des *Path Scan® Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kit* (Cell Signal Technology, Danvers) gemäß den Herstellerangaben analysiert. Hierbei binden die sich im Lysat befindlichen Proteine an auf Nitrocellulose aufgebrachte Antikörper. Die Detektion basiert auf eine durch die Meerrettich-Peroxidase (HRP)-vermittelte Reaktion. Die Absorption bei 680 nm wurde mit dem Odyssey CLx *Infrared Imaging System* (LI-COR, Lincoln) gemessen und mit der *Software Image Studio 3.0* (LI-COR, Lincoln) ausgewertet.

2.2.19. Semiquantitative mRNA-Expressionsanalysen (qRT-PCR)

Um die mRNA zu isolieren, wurden die Zellen mit 1 ml peqGOLD TriFast (PeqLab, Erlangen) lysiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt. Um die Ribonukleinsäure (RNA) von der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und den zellulären Proteinen zu trennen, wurde die Lösung vermischt und für 15 min bei 21.000 g zentrifugiert. Dadurch wurde die RNA (obere, wässrige Phase) angereichert und von der DNA (mittlere, milchige Phase) und den zellulären Proteinen (untere, organische Phase)

isoliert. Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase vorsichtig entnommen und in einem Verhältnis von 1:1 mit 2-Propanol p.a. (VWR Chemicals, Langenfeld) über Nacht bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA bei 21.000 g und 4 °C für 45 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die im Pellet befindliche RNA mit 75 % (v/v) Ethanol (Roth, Karlsruhe) gewaschen. Die RNA wurde bei 4 °C und 21.000 g für 15 min zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. Die RNA wurde getrocknet und in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Konzentration wurde mittels NanoDrop 1000 Spektrometers (Thermo Scientific, Waltham) gemessen.

Zur Bestimmung der mRNA-Expression wurden 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die daraus resultierende cDNA wurde in 100 µl RNase-freiem Wasser verdünnt.

Die Quantifizierung der transkriptionellen Genregulation erfolgte mit dem *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend der Herstellerangaben. Die Auswertung wurde mit einem *StepOnePlus RealTime PCR-System* (Thermo Fisher Scientific, Waltham) mit folgendem Programm durchgeführt.

| | | |
|------|-----|-----------|
| 50°C | 2' | 40 Zyklen |
| 95°C | 2' | |
| 95°C | 15" | |
| 60°C | 30" | |
| 95°C | 15" | |
| 60°C | 1' | |

Die Genexpression wurde mit den so erhaltenen Schwellenwerten (C_T) mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode für jede Probe relativ zur endogenen Kontrolle berechnet. Die Ausführung der qRT-PCR wurde freundlicherweise von Oliver Reiners durchgeführt.

2.2.20. Immunhistochemische Färbung von Cryo-Präparaten mit DAB

Proben murinen Tumorgewebes wurden nativ entnommen und in TissueTek®-Einbettmedium (Leica Microsystems, Wetzlar) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Anfertigung histologischer Schnitte erfolgte am Kryostat CM1850 (Leica Microsystems, Wetzlar) bei -20 °C. Die Schnittdicke betrug 10 µm. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte mit Aceton bei 4 °C für 15 min fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden für 30 min in der Blockierlösung (TBS + 5 % BSA + 5 % FCS) inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper. Dazu wurde die Blockierlösung 1:4 mit PBS verdünnt und der Erstantikörper darin entsprechend verdünnt. Der Objektträger wurde trockengewischt und das Gewebe mit

einem Fettstift umkreist. 50 µl Antikörper wurde direkt auf das Gewebe pipettiert und in einer Feuchtkammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Objektträger mit PBS gewaschen und es folgte eine fünfminütige Inkubation mit einer 3 %igen H₂O₂-Lösung. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für min. 1 h bei Raumtemperatur.

Für die Detektion wurden die Objektträger mit TB für 10 min gewaschen und im Anschluss mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift mit TB und H₂O_{dest} erfolgte die Kernfärbung mittels Hämalaun (Merck, Darmstadt). Nachdem die Proben mit einer 0,1 %igen HCl-Lösung gebläut wurden, wurden diese mit Leitungswasser gespült. Die Entwässerung der Schnitte erfolgte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (EtOH 70%, EtOH, 95%, EtOH p.a., jeweils 2 min) und Roticlear® (Roth, Karlsruhe; 5 min). Zum Eindecken wurden die Schnitte getrocknet und mit Roti®-Mount (Roth, Karlsruhe) beschichtet und mit einem Deckglas bedeckt.

2.2.21. Immunhistochemische Färbung mit DAB von Paraffinschnitten

Paraffinschnitte wurden mit einem Mikrotom RM2255 (Leica Microsystems, Wetzlar) in einer Dicke von 10 µm angefertigt und anschließend bei 60 °C für 1 h hitzefixiert. Die Schnitte wurden mittels Roticlear® (Roth, Karlsruhe, 3 mal 15 min) entparaffiniert, mittels absteigender Ethanolreihe (EtOH p.a., EtOH 95 %, EtOH 70 %, jeweils 2 min) hydratisiert und mit PBS gewaschen. Etwaige abgeschirmte Epitope wurden durch ein Antigen-*Retrieval* mit Citratpuffer (10 mM, Zytomed Systems, Berlin) in einem Dampfgerar freigelegt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Schnitte wie im Abschnitt 2.2.20 blockiert. Auch alle weiteren Schritte sind mit denen der Verarbeitung von Cryoschnitten identisch.

2.2.22. Affinitätszytochemie von HA

Zur Färbung der Hyaluronsäure wurden die Schnitte jeweils wie in den beiden zuvor beschriebenen Abschnitten bearbeitet. Lediglich ein zusätzlicher Blockierungsschritt vor der eigentlichen Fixierung mittels TBS + 5 % BSA + 5 % FCS wurde hinzugefügt. Dieser ist bei biotinylierten Antikörpern oder wie im Falle des biotinylierten Hyaluronsäure-Bindeprotein (Calbiochem, San Diego) notwendig. Dazu wurde *Endogenous Biotin-Blocking Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham) entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

2.2.23. Murines Xenograft Model der humanen Plattenepithelkarzinom Zelllinie A431

A431 Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase trypsiniert, zentrifugiert und in serumfreien DMEM + 1 % Penicillin-Streptomycin resuspendiert. Die Zellzahl

wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden in eiskalten Eppendorf-Gefäßen vorbereitet und in einem Verhältnis von 1:1 mit Wachstumsfaktor-reduzierten Matrigel vermischt (Corning, New York). In NMRI^{nu/nu} Nacktmäusen wurde subkutan in beide Flanken ein Gesamtvolumen von 200 µl (entsprach einer Zellzahl von 1×10^6) injiziert. Die subkutane Injektion der Tumorzellen wurde von Dr. Dr. Sören Twarock vorgenommen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Regressionsmodell wurde das Tumorstadium mit einer Schieblehre protokolliert und die Behandlung ab einer Tumorstadiumgröße von 300 mm³ eingeleitet. Die Tiere wurden wie in Tabelle 15 beschrieben behandelt.

Tabelle 15: Substanzen für die Behandlung und Art der Applikation des A431 Xenograft Models

| Substanz | Vektor | Applikationsform | Konzentration |
|-------------------|--|------------------|-----------------------|
| 4-MU | Futter | oral | 50g/kg Futter |
| Vcpal | 40% 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin | intravenös | 1,6 mg/ Applikation |
| (5Z)-7-Oxozeaenol | DMSO | intraperitoneal | 15mg/kg Körpergewicht |

Eine entsprechende Erlaubnis lag beim Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) unter dem Aktenzeichen Az 84-02.04.2013.A123 vor.

2.2.24. Statistik

Die Daten wurden mittels der Software Prism 7 (Graphpad Software, San Diego) analysiert. Bei Zellkulturversuchen wurde von einer Normalverteilung ausgegangen. Sofern eine Normalisierung auf eine Kontrolle vorgenommen wurde, wurde der ungepaarte Mann-Whitney-Test angewandt. Bei mehr als zwei Datensätzen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem *post-hoc*-Test nach Sidak vorgenommen. Waren die Werte abhängig von mehreren Faktoren (Bsp. Wachstumsverlauf der Tumore) wurde eine zweifaktorische ANOVA angewendet, ebenfalls mit anschließendem *post-hoc*-Test nach Sidak. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Von statistischer Signifikanz wurde bei einem Wert $p < 0,05$ ausgegangen.

3. Ergebnisse

3.1. Der Einfluss der Hyaluronsäure auf die Progression von Plattenepithelkarzinomen der Haut

3.1.1. Die veränderte Extrazellulärmatrix der kutanen Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 im Vergleich zu Keratinozyten

Für die Tumorprogression spielt die EZM in Hinblick auf Progression, Migration, Angiogenese und Metastasierung eine gewichtige Rolle. In Vorarbeiten konnte in humanen Proben gezeigt werden, dass bei einem PEK die Transkription der Gene *HAS3* (Hyaluronsäuresynthase 3), *HYAL1* (Hyaluronidase 1) und *HYAL2* (Hyaluronidase 2) gegenüber gesunder Haut signifikant erhöht ist (Benjamin Kellner, nicht veröffentlicht). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression diverser EZM-assoziiierter Gene zwischen der PEK-Zelllinie A431 und normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEKS) mit Hilfe einer qRT-PCR verglichen (Abbildung 5). Dabei wurde festgestellt, dass wie in den humanen Proben die zum HA-System gehörenden Gene *HAS3*, *HYAL1* und *HYAL2* hochreguliert sind. Matrix-Metalloproteasen (MMPs) oder die für die verschiedenen Kollagene kodierenden Gene sind unverändert.

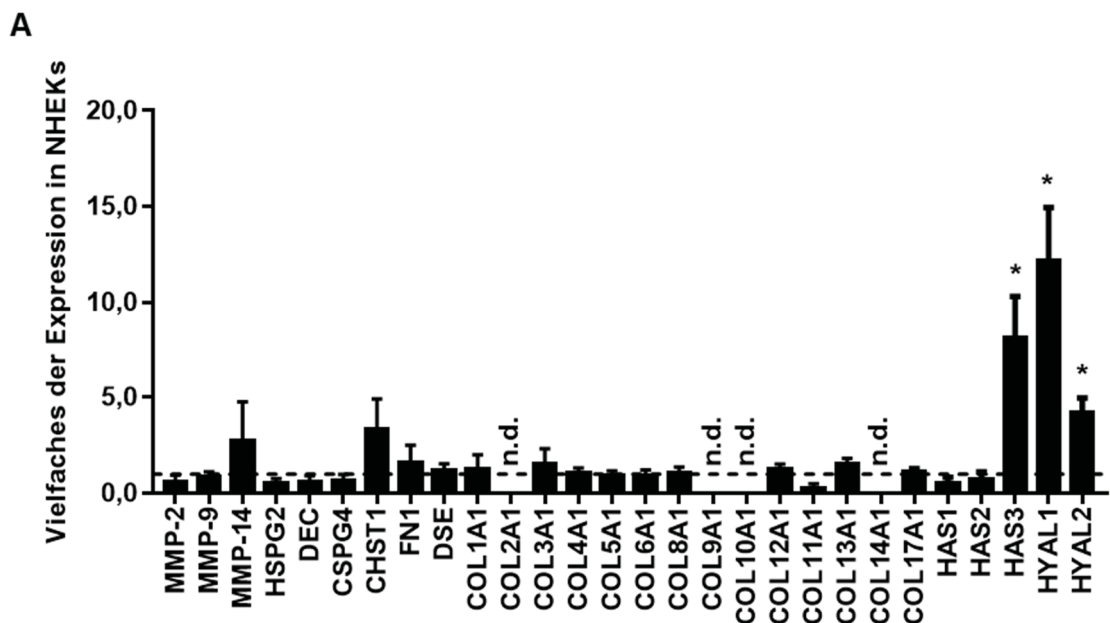


Abbildung 5: Vergleich der Expression von EZM-assoziierten Genen.

A, Vergleich von EZM-assoziierten Genen in A431 Zellen verglichen mit normalen humanen epithelialen Keratinozyten (NHEK) mittels qRT-PCR. **MMP-2**: Matrix-Metalloprotease 2, **MMP-9**: Matrix-Metalloprotease 9, **MMP-14**: Matrix-Metalloprotease 14, **HSPG2**: Heparansulfat Proteoglykan 2, **DEC**: Decorin, **CSPG4**: Chondroitinsulfat Proteoglykan 4, **CHST1**: Kohlenhydrat Sulfotransferase 1, **FN1**: Fibronectin 1, **DSE**: Dermatansulfat Epimerase, **COL1A1**: Alpha-1-Typ-I-Kollagen, **COL2A1**: Alpha-1-Typ-II-Kollagen, **COL3A1**: Alpha-1-Typ-III-Kollagen, **COL4A1**: Alpha-1-Typ-IV-Kollagen, **COL5A1**: Alpha-1-Typ-V-Kollagen, **COL6A1**: Alpha-1-Typ-VI-

Kollagen, **COL8A1**: Alpha-1-Typ-VIII-Kollagen, **COL9A1**: Alpha-1-Typ-IX-Kollagen, **COL10A1**: Alpha-1-Typ-X-Kollagen, **COL12A1**: Alpha-1-Typ-XII-Kollagen, **COL11A1**: Alpha-1-Typ-XI-Kollagen, **COL13A1**: Alpha-1-Typ-XIII-Kollagen, **COL14A1**: Alpha-1-Typ-XIV-Kollagen, **COL17A1**: Alpha-1-Typ-XVII-Kollagen, **HAS1**: Hyaluronsäuresynthase 1, **HAS2**: Hyaluronsäuresynthase 2, **HAS3**: Hyaluronsäuresynthase 3, **HYAL1**: Hyaluronidase 1, **HYAL2**: Hyaluronidase 2, **n.d.**: nicht detektierbar. n = 4. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,5.

3.1.2. Der *Knockdown* von *Hyal1* führt zu einem apoptotischen Phänotyp in A431 Zellen

Um die Funktion dieser Gene in den A431 Zellen näher zu analysieren, wurde die Expression durch das Einbringen gerichteter siRNAs gegen *HAS3*, *HYAL1* und *HYAL2* herabreguliert. Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass 96 h nach Transfektion die Transkription von *HAS3* um $58,3 \pm 8,3$ %, die von *HYAL1* um $56,7 \pm 10,2$ % und die von *HYAL2* um $82,2 \pm 3,0$ % reduziert war (Abbildung 6A). Die Zellen wurden nach 96 h hinsichtlich der Zellzahl, Proliferation und Apoptose analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die reduzierte Expression von *HYAL1* mit einer signifikanten Reduktion der Lebendzellzahl einherging ($42,7 \pm 2,4$ % gegen siKontrolle, Abbildung 6B). Durch die Bestimmung der Intensität von zuvor mit Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidylester (CFSE) gefärbten A431 Zellen, konnte festgestellt werden, dass die proliferative Rate nicht beeinflusst wurde (Abbildung 6C). Jedoch war sowohl der Anteil der Zellen in der subG1-Phase (Abbildung 6D), als auch die Spaltung des Apoptose-Markers Poly-ADP-Ribose-Polymerase (Abbildung 6E) signifikant erhöht.

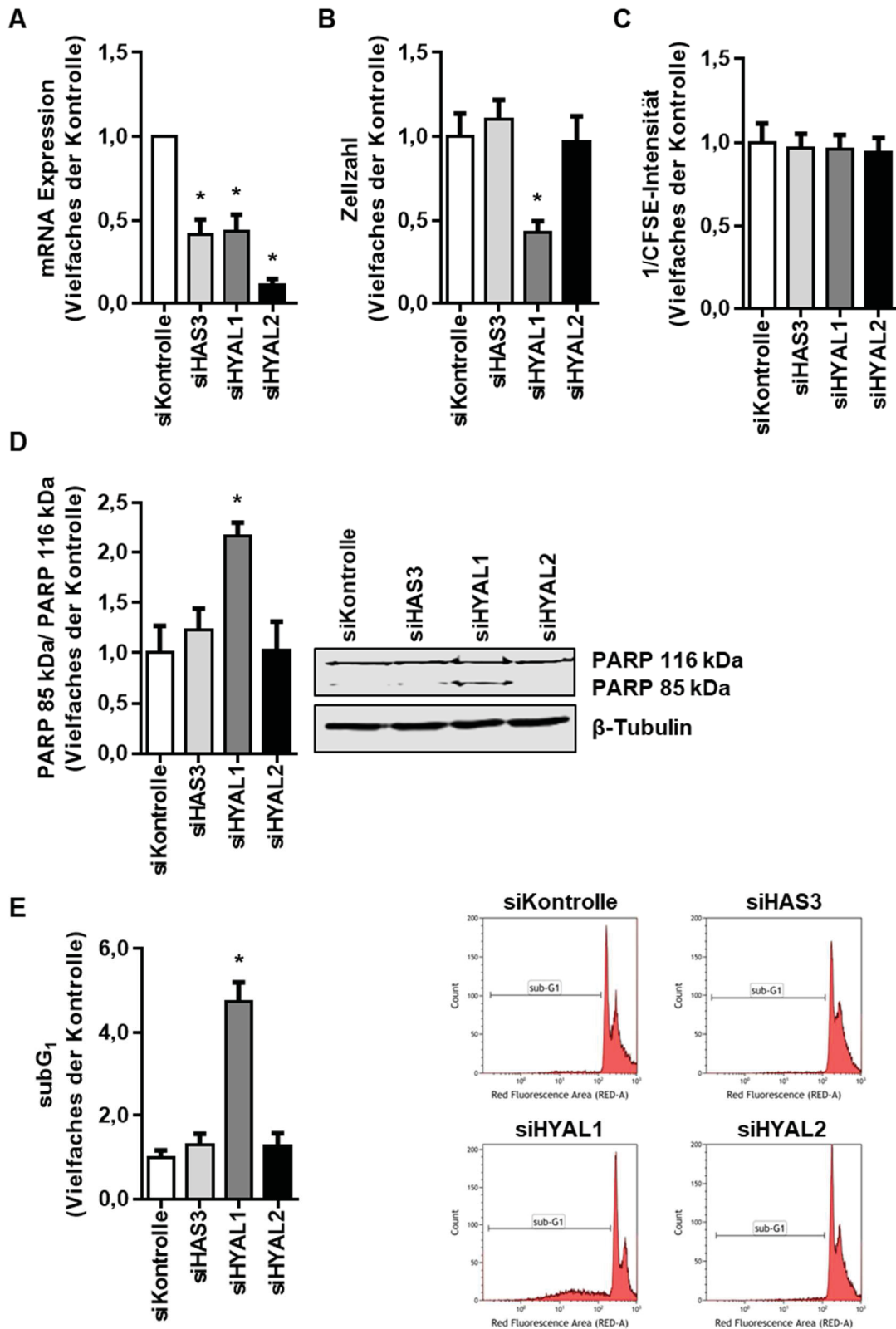


Abbildung 6: Die Herabregulierung der Transkription von *HYAL1* führt zu einem apoptotischen Phänotyp in A431 Zellen.

A431 Zellen wurden mit siRNAs gerichtet gegen *HAS3*, *HYAL1* und *HYAL2* transfiziert. **A**, Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels qRT-PCR. 96 h nachdem die Zellen mit der siRNA transfiziert wurden, wurde die **B**, Zellzahl, **C**, proliferative Rate mittels CFSE-Färbung, **D**, Spaltung des Apoptosemarkers PARP und **E**, der Anteil der Zellen in der subG1- Phase bestimmt. n = 4. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu siKontrolle.

Die um 58% reduzierte Expression von *HAS3* nach si*HAS3*-Transfektion führte zu einer signifikanten Reduktion der HA-Sekretion. Dazu wurde der Gehalt der in den Überstand sezernierten HA mit Hilfe eines ELISA-artigen, immunturbidimetrischen Assays quantifiziert (Abbildung 7).

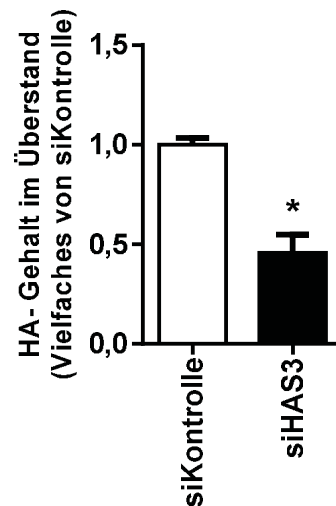


Abbildung 7: Herabregulierung der Expression von *HAS3* führt zu einer reduzierten Sezernierung der HA in den Überstand.

A431 Zellen wurden mit *siHAS3* transfiziert. 96 h nach Transfektion wurde der Überstand entnommen und mit Hilfe des *Hyaluronic Acid Test Kit* (Corgenix, Colorado) analysiert. Die Ergebnisse wurden auf die Proteinkonzentration des Zellysats normalisiert. n = 6. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05.

Um zu untersuchen, ob die Reduktion von *HYAL1* auch einen Einfluss auf die Apoptoserate von nicht transformierten Zellen hat, wurden NHEKs und normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) ebenfalls mit *siHYAL1* transfiziert und der Anteil der Zellen in der subG₁-Phase mittels Nicoletti-Assay ermittelt. Dabei wurde beobachtet, dass die Behandlung mit *siHYAL1* im Vergleich zu den kontrollbehandelten Zellen zu keiner Erhöhung der Apoptoserate führte (Abbildung 8B) und somit die apoptotischen Effekte einer reduzierten *HYAL1*-Expression tumorspezifisch zu sein schienen.

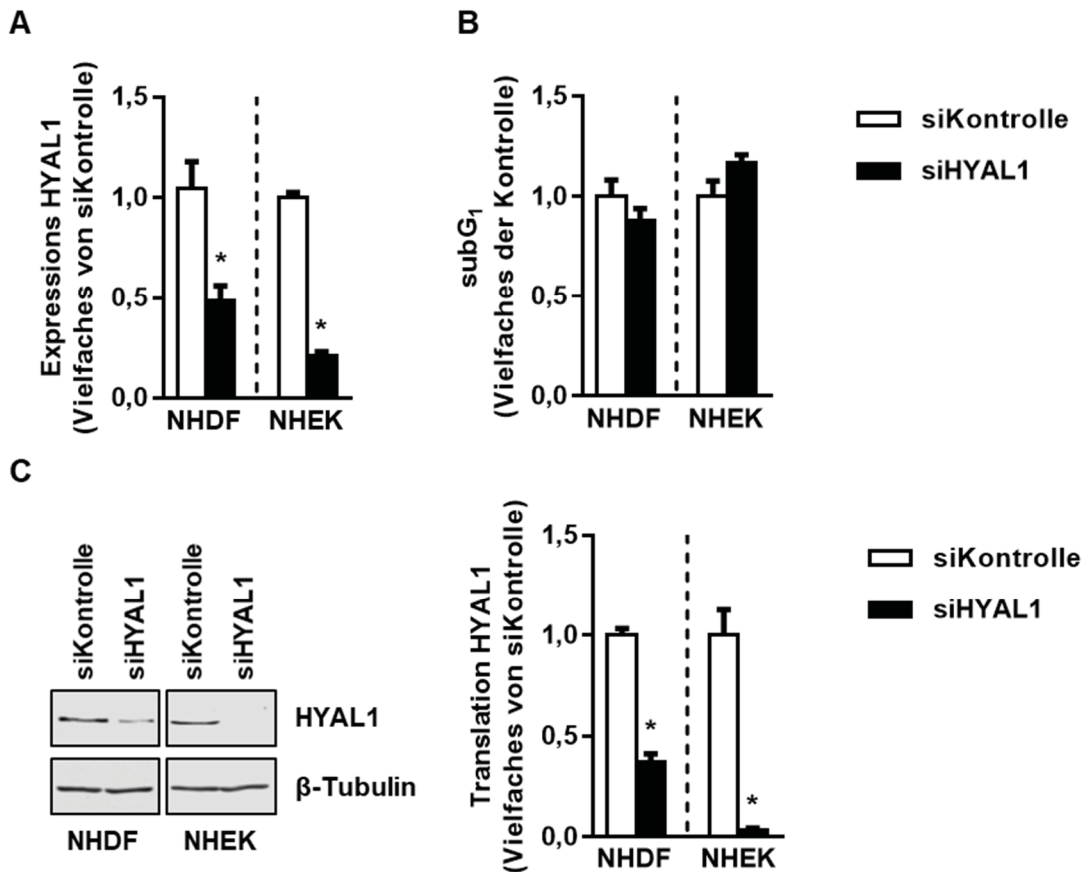


Abbildung 8: Herabregulierung von *HYAL1* in den nicht transformierten Zelllinien NHEK und NHDF führt zu keinem apoptotischen Phänotyp.

A, Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels qRT-PCR. **B**, Anteil der Zellen in der subG₁-Phase 96 h nach Transfektion. **C**, Semiquantitative Analyse der *HYAL1*-Proteinsynthese mittels Immunoblot. β -Tubulin wurde als endogene Kontrolle detektiert. n = 4. Mittelwerte \pm SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu siKontrolle.

Um auszuschließen, dass diese Beobachtungen auf eine nicht ausreichende Reduktion von *HYAL1* auf Proteinebene zurückzuführen sind, wurde die Proteinmenge semiquantitativ mittels Immunoblot ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass nach siHyal1-Behandlung die Menge an *HYAL1* im Vergleich zur Kontrolle in den NHDFs um $62,5 \pm 4,6$ % und in den NHEKs um $96,7 \pm 1,3$ % reduziert war (Abbildung 8C).

3.1.3. Reduktion der *HYAL1*-Expression beeinflusst die Größe von Lysosomen

HYAL1 ist sowohl im extrazellulären Raum, als auch intrazellulär in den Lysosomen lokalisiert und spaltet die Hyaluronsäure (HA) in Fragmente undefinierter Länge. Extrazelluläre, durch Hyaluronidase 2 (*HYAL2*) gesplattene HA bindet an CD44 und wird durch Endozytose in die Lysosomen transportiert, wo diese durch *HYAL1* weiter degradiert wird. Um den Einfluss einer reduzierten *HYAL1*-Expression auf die Lysosomen zu untersuchen, wurden A431 Zellen mit siHYAL1 behandelt und 48 h nach

Transfektion fixiert. Die Lysosomen wurden im Anschluss mit dem Farbstoff *Lysotracker™ Red DND-99* (Thermo Fisher Scientific, Waltham) gefärbt. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass durch die reduzierte *HYAL1*-Expression die HA in den Lysosomen akkumuliert. Tatsächlich konnte bei den *siHYAL1* behandelten Zellen eine Vergrößerung der Lysosomen in Vergleich zu mit *siKontrolle* transfizierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 9A).

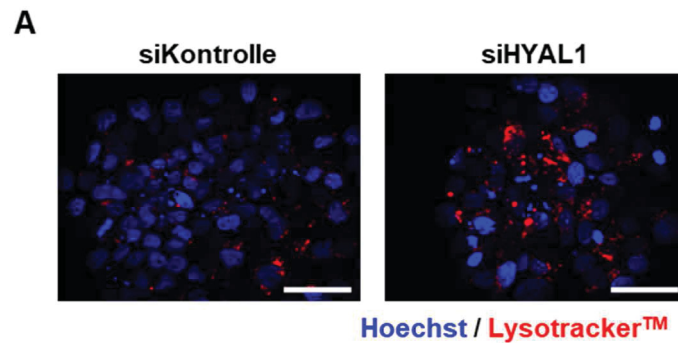


Abbildung 9: Reduktion der *HYAL1*-Expression in A431 Zellen führt zu einer Vergrößerung der Lysosomen.

A, Färbung der Nuklei mit DAPI (blau) und der Lysosomen mit *Lysotracker™ Red DND-99* (rot) von A431 Zellen 48 h nach der Transfektion mit *siHYAL1*. Maßstabsbalken $\approx 50 \mu\text{M}$.

3.1.4. Reduktion der *HYAL1*-Expression beeinflusst die Aktivierung von TAK1

Im Folgenden wurde untersucht, welcher Signalweg durch die Reduktion von *HYAL1* reguliert ist und somit für die erhöhte Apoptoserate verantwortlich sein könnte. Dazu wurden A431 Zellen erneut mit *siHYAL1* behandelt und mit kontrollbehandelten Zellen mit Hilfe des *Path Scan® Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kit* (Cell Signal Technology, Danvers) verglichen. Der signifikante Anstieg der Spaltungsprodukte von PARP und Caspase-3 bestätigten dabei den zuvor beobachteten apoptotischen Phänotyp (Abbildung 10A). Des Weiteren wurde ein signifikanter Anstieg von I κ B α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) nachgewiesen. Letzteres kann durch die beobachtete Reduktion von phosphoryliertem Tak1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1) am Ser412-Rest, welche essenziell für die Aktivierung ist, erklärt werden (Ouyang *et al.*, 2014).

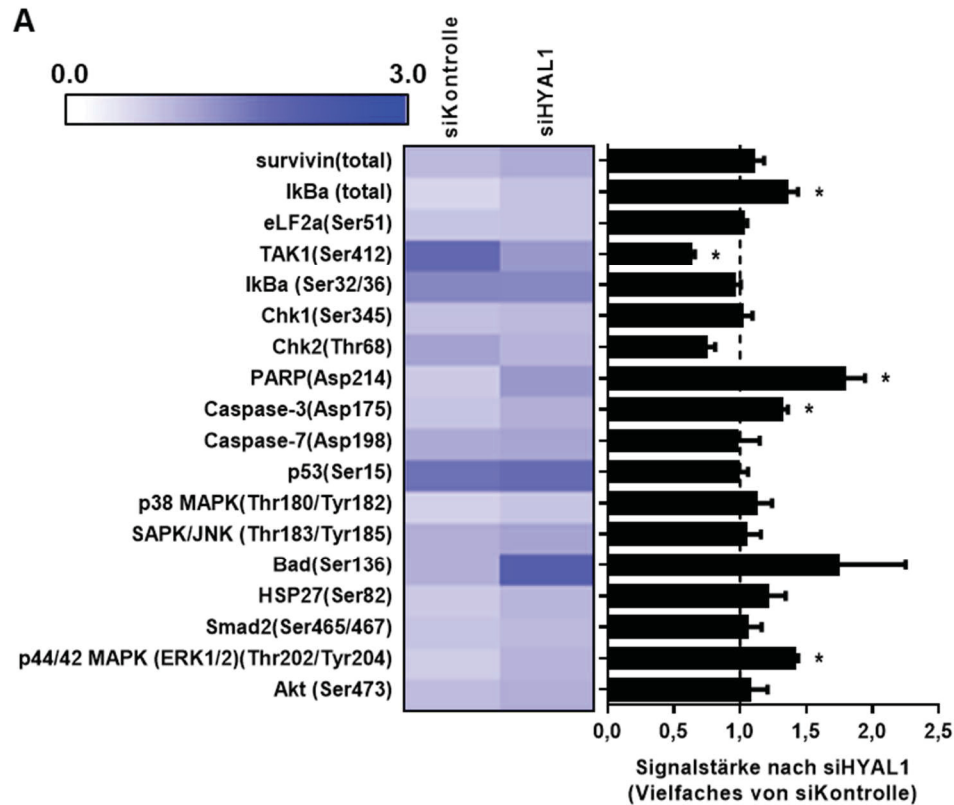


Abbildung 10: Untersuchung apoptotischer Signalwege in *siHYAL1* transfizierten A431 Zellen.

A431 Zellen wurden mit *siHYAL1* behandelt und 96 h nach Transfektion mit dem *PathScan® Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kits* analysiert. Dargestellt ist die Signalstärke als heatmap (links) und die Quantifizierung der Signalintensität (rechts), wobei die Normierung auf kontrolltransfizierte Zellen stattfand. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM. *, $p < 0,05$. Getestet mit einem t-Test zwischen siKontrolle und *siHYAL1* aller Signalstärken der getesteten Proteine.

Die reduzierte Phosphorylierung am Ser412-Rest und die gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 an Thr202/Tyr204 konnte anschließend in Immunoblot-Analysen validiert werden (Abbildung 11A und B). TAK1 kann durch TGF- β 1 aktiviert werden [140]. Daher wurde untersucht, ob die durch siHyal1 reduzierte Phosphorylierung von TAK1 und die damit einhergehende erhöhte Apoptoserate der A431 Zellen durch die exogene Gabe von TGF- β 1 aufgehoben werden kann. Durch Western-Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass durch die exogene Gabe von TGF- β 1 die Phosphorylierung von TAK1 am Ser412-Rest sogar über das Niveau der kontrollbehandelten A431 Zellen gesteigert werden konnte (Abbildung 11A). Des Weiteren wurden die Spaltung von PARP und auch der Anteil der Zellen in der subG₁-Phase signifikant verringert (Abbildung 11C und D).

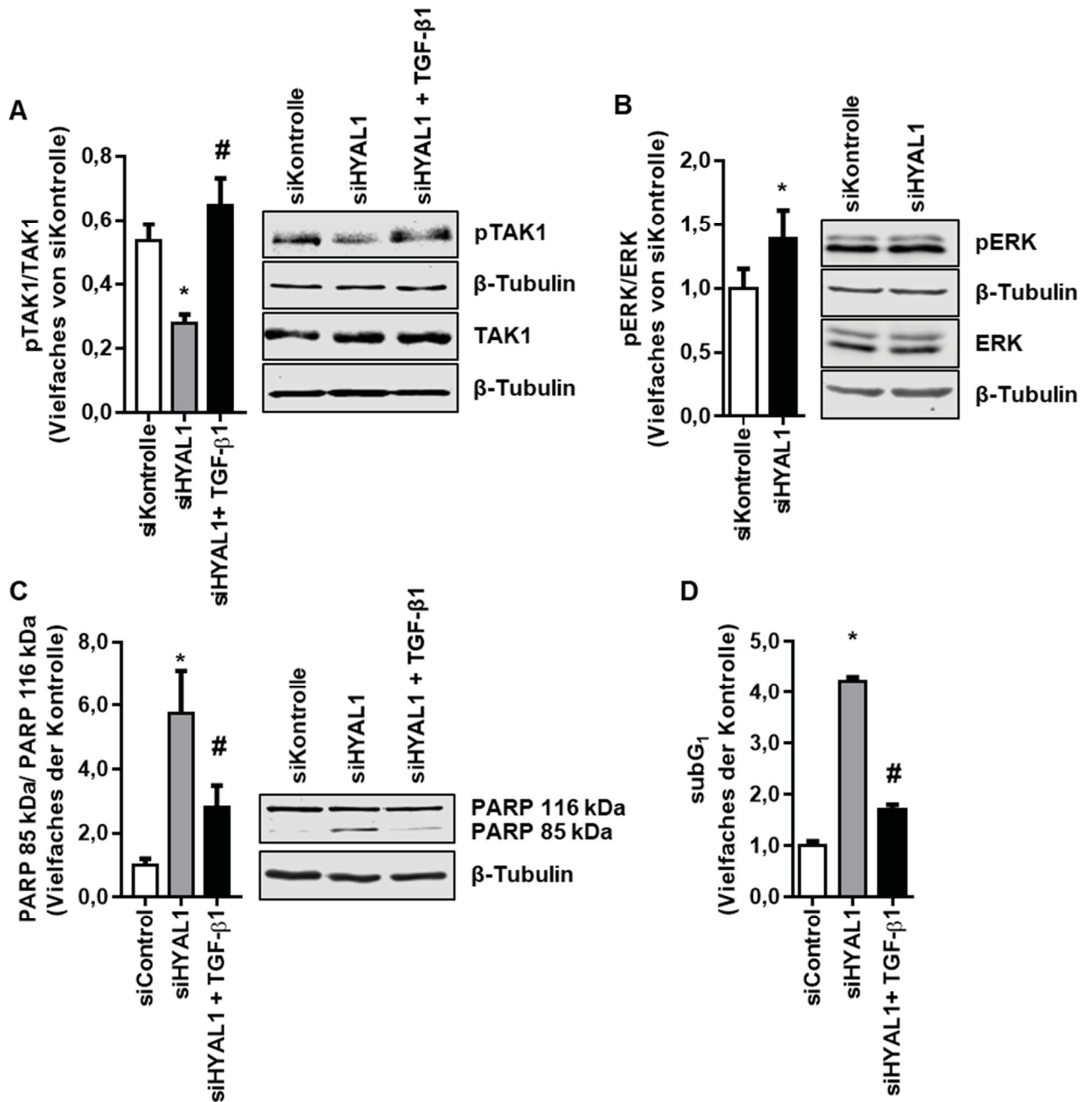


Abbildung 11: Der apoptotische Phänotyp nach siHYAL1 ist abhängig von der Aktivierung von TAK1.

A, Phosphorylierungsstatus von TAK1 am Ser412-Rest nach Herabregulation von HYAL1 und der simultanen Behandlung mit TGF-β1 (10 ng/ml) ermittelt durch Immunoblot-Analysen. Die Ergebnisse wurden im Verhältnis zum gesamten TAK1 dargestellt und auf die siKontrolle normiert. **B**, Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 am Thr202/Tyr204-Rest nach siHYAL1 im Verhältnis zum gesamten ERK1/2. **C**, Spaltung von PARP und **D**, der Anteil der Zellen in der subG₁-Phase nach siHYAL1 und siHYAL1 mit simultaner TGF-β1 (10 ng/ml) Behandlung. n = 4. Mittelwert ± SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu siKontrolle. #, p < 0,05 im Vergleich zu siHYAL1.

Anschließend wurde die Aktivierung von TAK1 in A431 Zellen direkt durch die Gabe von (5Z)-7-Oxozeaenol inhibiert und die Zellen 48 h nach Stimulation analysiert. Es konnte

eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl beobachtet werden (Abbildung 12A). Bei 1 μM und 5 μM (5Z)-7-Oxozeaenol wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zellen in der subG₁-Phase beobachtet (Abbildung 12C). Die Proliferation war bei beiden Konzentrationen gleichermaßen reduziert (Abbildung 12B).

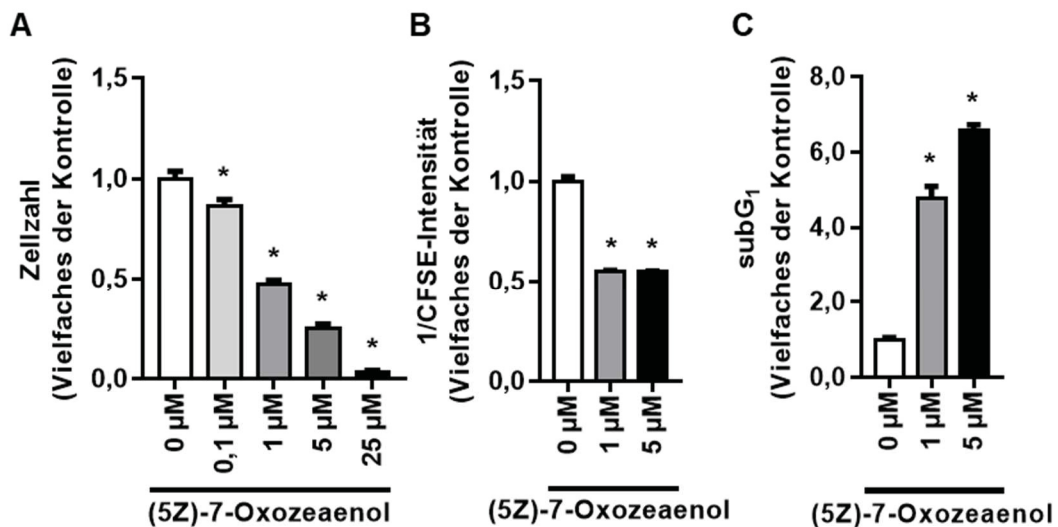


Abbildung 12: Inhibition der Aktivierung von TAK1 führt zu einem apoptotischen Phänotyp in A431 Zellen.

A, A431 Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen des spezifischen TAK1-Inhibitors (5Z)-7-Oxozeaenol behandelt und im Anschluss die Zellzahl bestimmt. **B**, Bestimmung der Proliferationsrate durch CFSE markierten A431 Zellen nach Behandlung mit 1 und 5 μM (5Z)-7-Oxozeaenol. **C**, Bestimmung der apoptotischen Rate mittels durchflusszytometrischer Messung des Zellzyklus. n = 4. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu 0 μM (5Z)-7-Oxozeaenol.

3.1.5. Einfluss von Hyal1 auf die Expression anti-apoptotischer Gene

Ein wichtiges Zielprotein der Kinase TAK1 ist I κ B α , welches durch Phosphorylierung für die Degradation durch das Proteasom zugänglich wird. Sobald I κ B α abgebaut ist, kann der Transkriptionsfaktor NF κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) in den Kern translozieren und die Expression anti-apoptotischer Gene aktivieren. Durch qRT-PCR Analysen nach siHYAL1 Behandlung wurde die Expression der Gene *clAP1* (*cellular inhibitor of apoptosis protein-1*), *clAP2* (*cellular inhibitor of apoptosis protein-2*) und *XIAP* (*X-linked inhibitor of apoptosis*) bestimmt. Diese spielen auf Grund ihrer inhibitorischen Wirkung auf diverse Caspasen eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose.

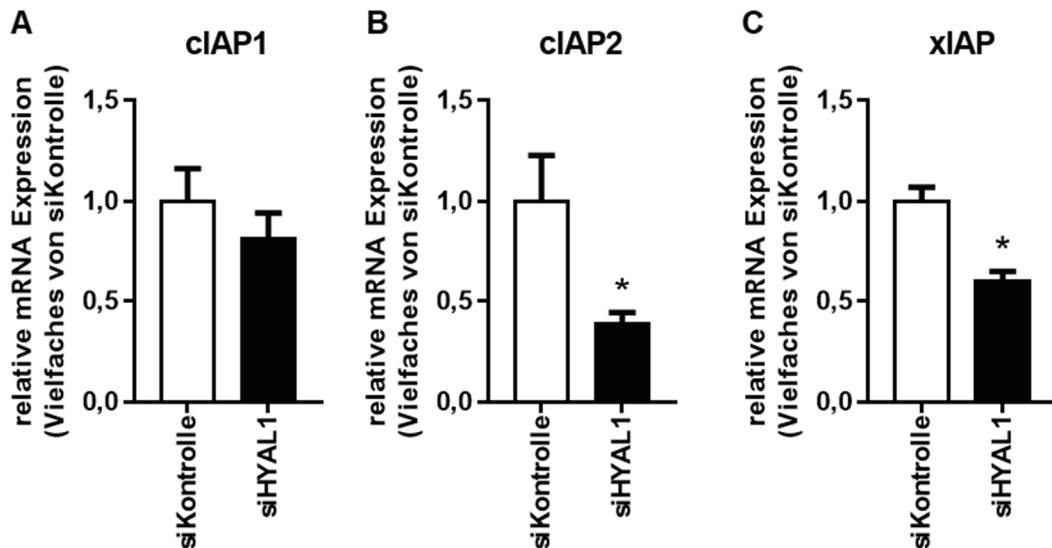


Abbildung 13: Der Einfluss von HYAL1 auf NF κ B Effektorgene.

96 h nachdem A431 Zellen mit *siHYAL1* transduziert wurden, wurde die Expression der Gene **A**, *cIAP1*, **B**, *cIAP2* und **C**, *XIAP* mittels qRT-PCR bestimmt. n = 4. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu siKontrolle.

Dabei wurde beobachtet, dass die Expression der Gene *cIAP2* und *XIAP* signifikant reduziert war (Abbildung 13B und C).

3.1.6. Hyal1 reguliert die Aktivierung von TAK1 über den Toll-ähnlichen Rezeptor 4

In verschiedenen pathologischen Modellen konnte gezeigt werden, dass niedermolekulare HA, wie sie durch die Degradation durch HYAL1 entsteht, durch die Interaktion mit dem Toll-ähnlichen Rezeptor 4 (TLR4) eine pro-inflammatorische, aber auch anti-apoptotische Signalübertragung vermittelt [141, 142]. Daher wurde als nächstes überprüft, ob die Inhibition des TLR4 mittels des spezifischen Inhibitors CLI-095, einen Einfluss auf den zuvor beschriebenen apoptotischen Phänotyp hat.

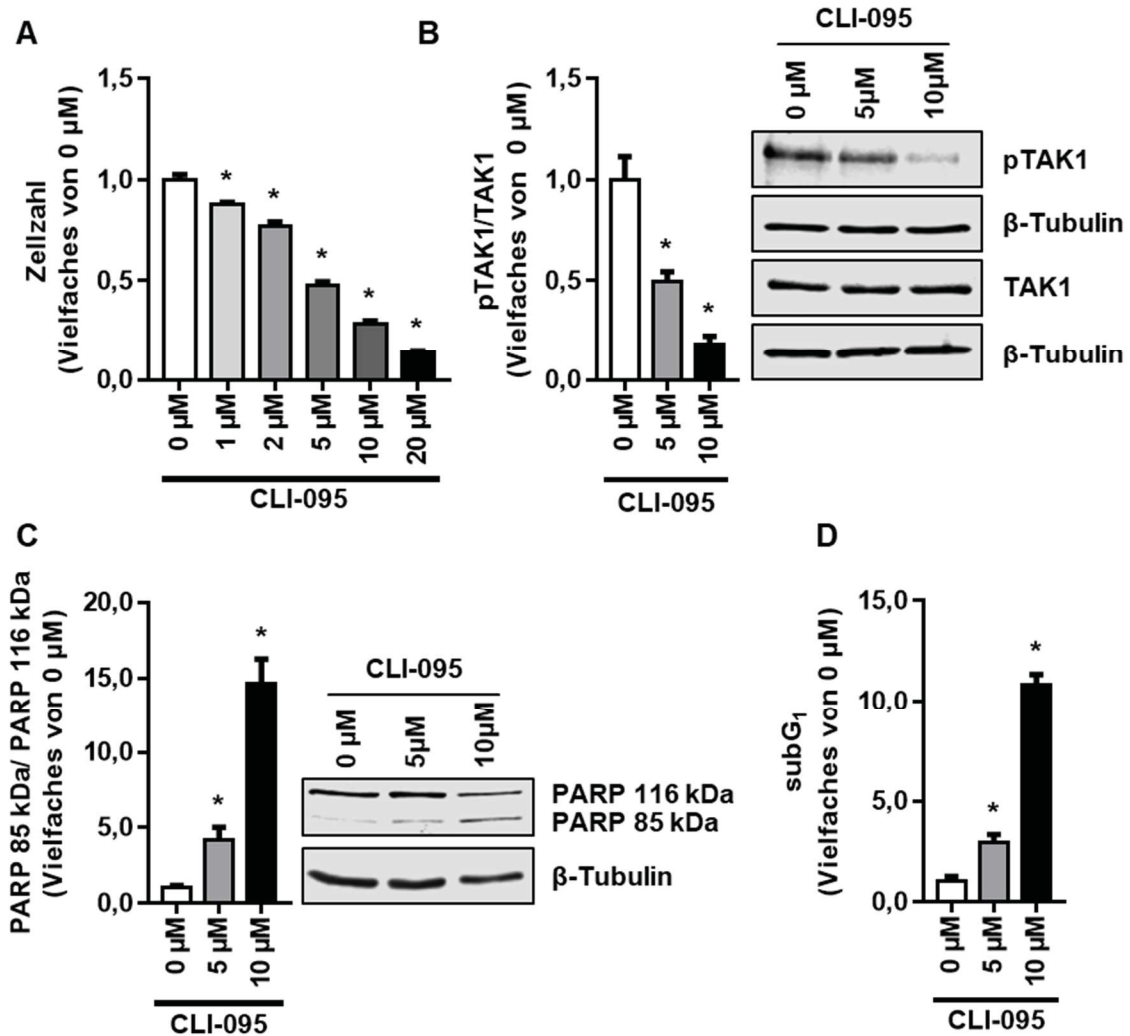


Abbildung 14: Inhibition des Toll-ähnlichen Rezeptors 4 (TLR4) reduziert die Phosphorylierung von TAK1 und führt zu einem apoptotischen Phänotyp in A431 Zellen.

A, A431 Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen des spezifischen TLR4-Inhibitors CLI-095 behandelt und im Anschluss die Zellzahl bestimmt. Der Einfluss von 5 und 10 μM CLI-095 auf die **B**, Phosphorylierung von TAK1 am Ser412 wurde mittels Immunoblots analysiert. Die apoptotische Rate wurde durch die **C**, semiquantitative Auswertung der Spaltung von PARP und der **D**, durchflusszytometrischen Analyse der Zellen in der subG₁-Phase ermittelt. n = 4. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05.

Nachdem A431 Zellen für 48 h mit CLI-095 stimuliert wurden, wurde eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl festgestellt (Abbildung 14A). Der Anteil der Zellen in der subG₁-Phase und die Spaltung von PARP waren bei einer Stimulation der Zellen mit 5 und 10 μM signifikant erhöht (Abbildung 14C und D). Damit einhergehend wurde eine abnehmende Phosphorylierung von TAK1 am Ser412-Rest beobachtet (Abbildung 14B).

3.1.7. Pharmakologische Modulation des Hyaluronsäuresystems der A431 Zellen induziert Apoptose

Da das HA System für die Progression des Plattenepithelkarzinoms von großer Bedeutung zu sein schien, wurde dieses pharmakologisch moduliert. Zum einen wurde die Synthese der HA mit Hilfe des HA-Synthese-Inhibitors 4-Methylumbelliferon (4-MU; 100 μM) und zum anderen die Aktivität der Hyaluronidasen mittels Palmitinsäureascorbylester (Vcpal, 250 μM) inhibiert. Beide Inhibitoren führten zu einer Abnahme der Zellzahl nachdem die Zellen für 48 h behandelt wurden (Abbildung 15A). Die Behandlung mit 4-MU führte zu einer leichten ($29,8 \pm 12,3\%$), die Behandlung mit Vcpal ($71,3 \pm 13,3\%$) zu einer drastischen Reduktion der Phosphorylierung von TAK1 am Ser412-Rest (Abbildung 15E). Diese resultierte in Übereinstimmung mit den vorherigen Versuchen in einer erhöhten Apoptoserate, die durch eine vermehrte Spaltung von PARP und einem Anstieg der Zellen in der subG1-Phase nachgewiesen wurde (Abbildung 15C und D). Die proliferative Rate wurde sowohl durch 4-MU, als auch Vcpal reduziert (Abbildung 15B).

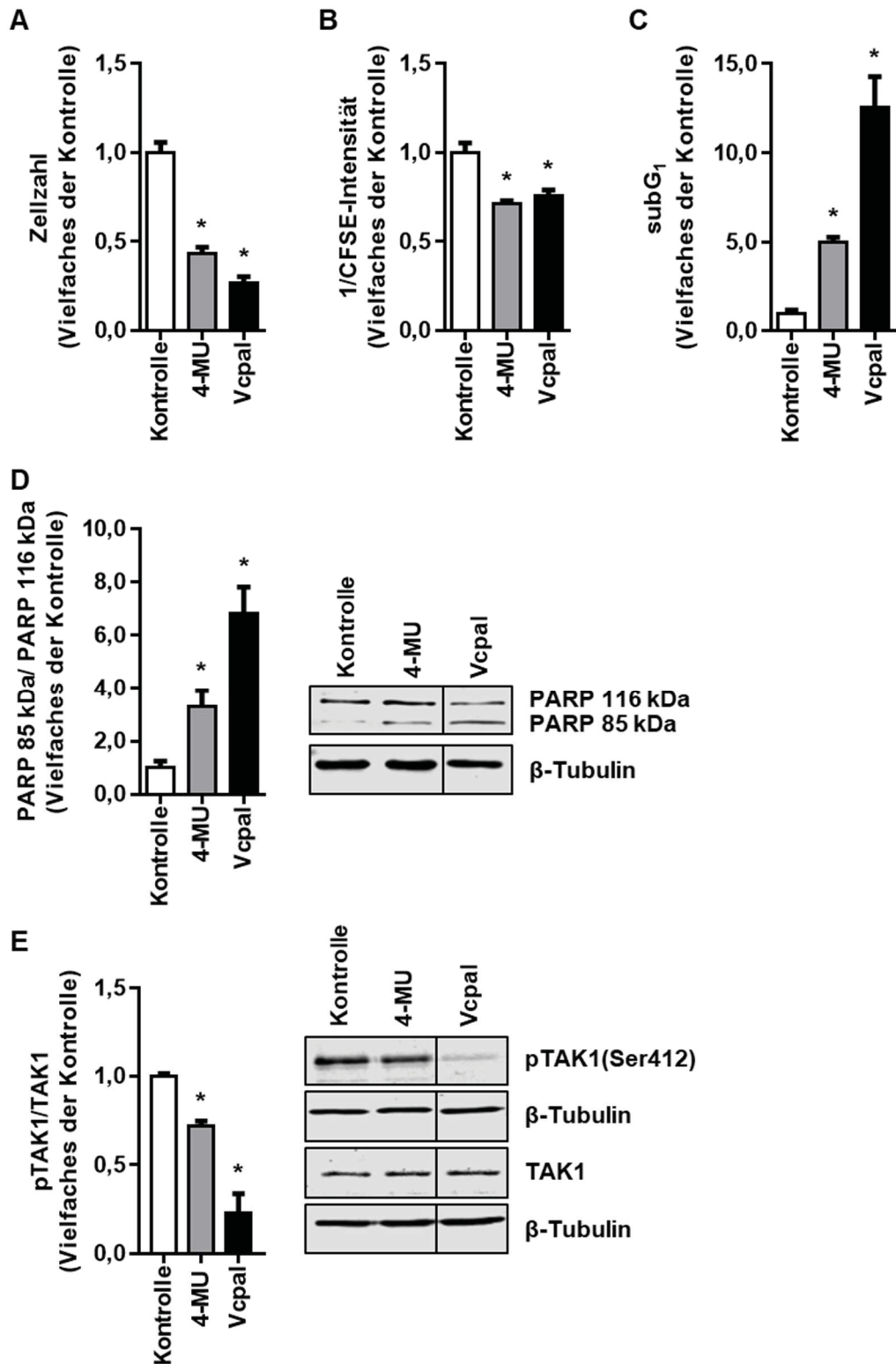


Abbildung 15: Pharmakologische Modulation des HA-Systems führt zu einem TAK1-abhängigen apoptotischen Phänotyp.

A431 Zellen wurden 48 h mit dem HA-Synthese-Inhibitor 4-MU (100 μ M) und dem Hyaluronidase-Inhibitor Vcpal (250 μ M) stimuliert und bezüglich der **A**, Zellzahl, **B**, Proliferation, **C**, Anteil der Zellen in der subG₁-Phase und **D**, Spaltung des Apoptosemarkers PARP analysiert. **E**, Einfluss von 4-MU (100 μ M) und Vcpal (250 μ M) auf die Phosphorylierung von TAK1 am Ser412-Rest. n = 4. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle

Indem die Lysosomen der Zellen gefärbt wurden, konnte festgestellt werden, dass durch die Behandlung mit Vcpal, die Größe dieser Organellen dosisabhängig zunahm (Abbildung 16A). Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit 4-MU im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf dieses Organell.

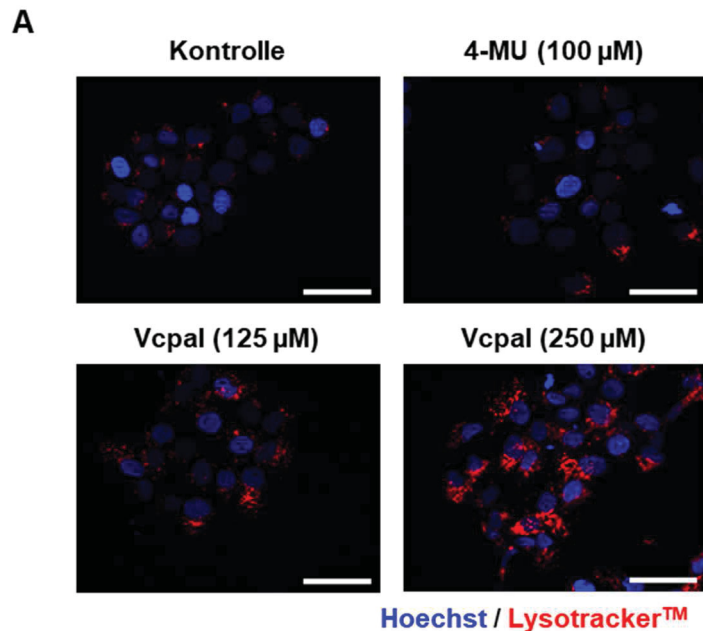


Abbildung 16: Pharmakologische Inhibition der Hyaluronidasen führt zu einer Vergrößerung der Lysosomen.

A, A431 Zellen wurden für 48 h mit 4-MU (100 µM) und Vcpal (125 und 250 µM) behandelt und im Anschluss fixiert. Die Nuklei wurden mit DAPI (blau) und die Lysosomen mit *Lysotracker™ Red DND-99* (rot) gefärbt. Maßstabsbalken \cong 50 µM.

3.1.8. Einfluss der Hyaluronsäure auf die Motilität von A431 Zellen

Viele Schritte der Tumorprogression, wie zum Beispiel die Invasion in das umliegende gesunde Gewebe, das Eindringen in die Blut- und Lymphgefäße oder die Bildung einer Fern-Metastase sind abhängig von der Motilität der Zellen. Um zu untersuchen, ob in diesem Zusammenhang das HA-System eine bedeutende Rolle einnimmt, wurden die Gene *HAS3*, *HYAL1* und *HYAL2* herabreguliert und die Zellen 24 h nach Transfektion für einen Zeitraum von 24 h mittels Zeitraffer-Mikroskopie aufgenommen. Die akkumulierte, zurückgelegte Distanz der Zellen wurde manuell verfolgt und ausgewertet.

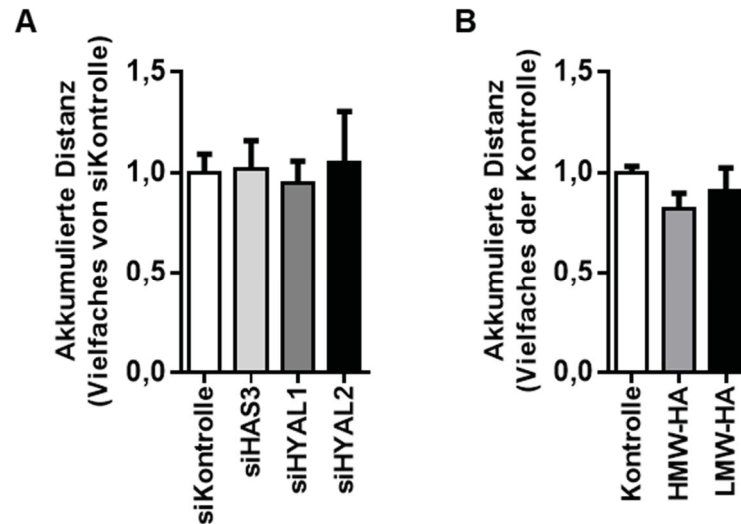


Abbildung 17: Das HA-System beeinflusst nicht die Motilität von A431 Zellen *in vitro*.

Die Motilität von A431 Zellen wurde mittels Zeitraffer-Mikroskopie nach **A**, Herabregulierung der Gene *HAS3*, *HYAL1* und *HYAL2* durch die Transfektion gerichteter siRNAs oder **B**, der exogenen Behandlung mit hoch- (HMW-HA) bzw. niedermolekularer HA (LMW-HA). n = 4. Mittelwert ± SEM. *, p < 0,05.

Dabei ergab sich, dass die Herabregulierung aller Gene keinen Einfluss auf die Motilität der Zellen hat (Abbildung 17A). In einem nächsten Schritt wurden die Zellen exogen mit hoch- (HMW-HA) bzw. niedermolekularer HA (LMW-HA) behandelt und 24 h nach Stimulation erneut für 24 h analysiert. Auch hier ergab die Analyse, dass die HA *in vitro* keinen Einfluss auf die Motilität hat (Abbildung 17B).

3.1.9. Auswirkung der Inhibition von TAK1, der Hyaluronsäure-Synthese und der Hyaluronidasen im A431 Xenograft Regressionsmodell

Die *in vitro* beobachteten Effekte von 4-MU, Vcpal und (5Z)-7-Oxozeaenol auf die Progression von Plattenepithelkarzinomen sollten *in vivo* verifiziert werden. Dazu wurden A431 Zellen subkutan in beide Flanken weiblicher NMRI^{nu/nu}-Mäuse injiziert und das Wachstum der so entstandenen Tumore im Regressionsmodell untersucht. Die Behandlung erfolgte täglich sobald einer der Tumore eine Größe von 300 mm³ erreichte. Die Applikation von 4-MU (50g/kg Futter) erfolgte oral über das Futter. Dabei wurde ein reduziertes Wachstum der Tumore festgestellt, die am sechsten Tag der Behandlung zu einem signifikanten Größenunterschied zwischen den 4-MU-behandelten Tieren, im Vergleich zur Kontrollgruppe, resultierte (Abbildung 18A und B).

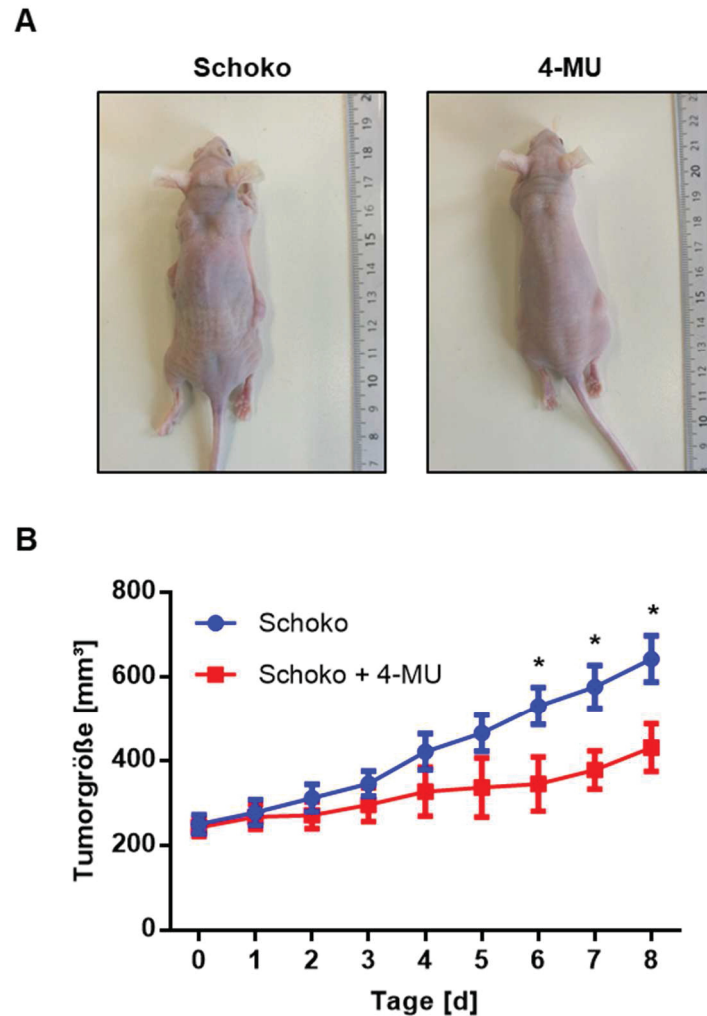


Abbildung 18: 4-MU reduziert das Wachstum von A431 Zellen im murinen Xenograftmodell. **A**, Lichtbildaufnahmen der behandelten Mäuse nach 8tägiger Behandlung. **B**, Wachstumsverlauf der Tumore. NMRI^{nu/nu}-Mäuse wurden entweder mit Haltungsfutter mit Schokoladenaroma (Schoko, blau) oder Haltungsfutter mit Schokoladenaroma + 4-MU (50g/kg Futter, 4-MU, rot) behandelt. n = 10/8. Mittelwert ± SEM. *, p < 0,05.

Die Applikation von Vcpal erfolgte intravenös über die Schwanzvene. Dafür musste die hydrophobe Substanz Vcpal in eine wässrige Lösung gebracht werden. Dazu wurde 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin als Vektor verwendet. Cyclodextrine gehören zu den zyklischen Oligosacchariden, welche α -1,4-glykosidisch verknüpft sind, wodurch eine toroidale Struktur entsteht, welche sich nach außen hydrophil verhält und im Inneren eine hydrophobe Tasche bildet. Um zu untersuchen, ob das in Cyclodextrin gelöste Vcpal noch immer eine apoptotischen Wirkung auf A431 Zellen hat, wurden die Zellen mit Vcpal, welches wie in Kapitel 3.1.73.1.7 in EtOH (Ethanol) und BSA (bovines Serumalbumin) gelöst wurde, behandelt und mit der Wirkung von in Cyclodextrin gelöstem Vcpal *in vitro* verglichen. Mittels durchflusszytometrischer Bestimmung des Zellzyklus wurde der Anteil der Zellen in der subG₁-Phase bestimmt. Dabei konnte

beobachtet werden, dass das in Cyclodextrin gelöste Vcpal schon bei einer Konzentration von 25 μM apoptotisch wirkte (Abbildung 19A, Balken 6). Cyclodextrin selbst hatte keine apoptotische Wirkung auf die Zellen (s. Abbildung 19A, Balken 2).

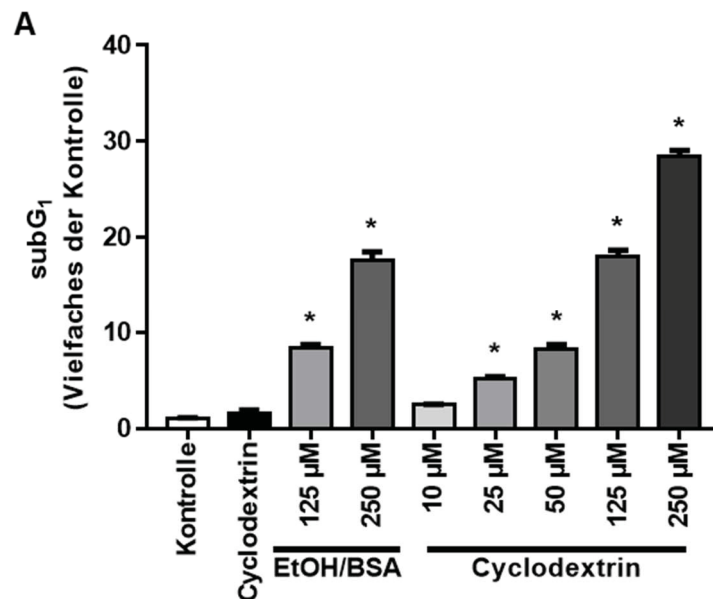


Abbildung 19: In 40% Cyclodextrin gelöstes Vcpal induziert Apoptose in A431 Zellen *in vitro*.

Die apoptotische Wirkung von Vcpal, welches in einer wässrigen Lösung mit 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin gelöst wurde, auf A431 Zellen wurde mit Vcpal, welches in einer 12,5%-BSA-EtOH-Lösung gelöst wurde, verglichen. **A**, Bestimmung des Anteils der Zellen in der subG₁-Phase mittels Durchflusszytometrie. n = 4. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05.

Für die *in vivo* Behandlung wurde eine Lösung mit 1,0 mg/ml Vcpal hergestellt. Die Behandlung der Tiere fand auch hier täglich statt. Bereits am fünften Tag war ein signifikant langsames Tumor-Wachstum bei den Vcpal-behandelten Tieren zu beobachten (Abbildung 20B).

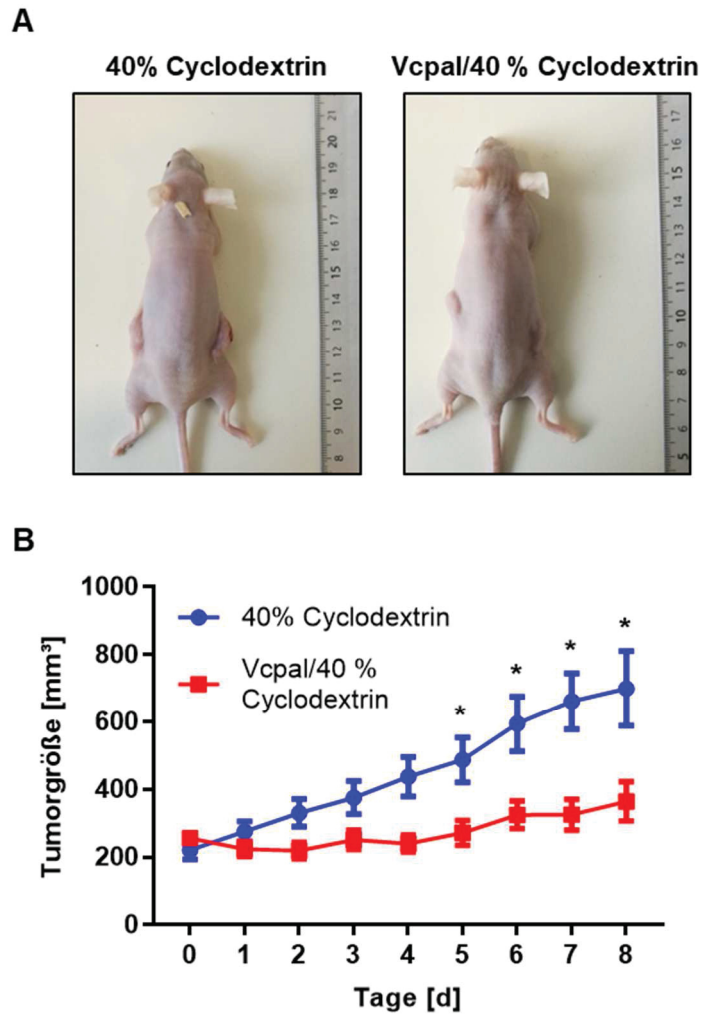


Abbildung 20: Vcpal reduziert das Wachstum von A431 Zellen im murinen Xenograftmodell.

A, Lichtbildaufnahmen der behandelten Mäuse nach 8tägiger Behandlung. **B**, Wachstumsverlauf der Tumore. NMRI^{nu/nu}-Mäuse wurden entweder mit 40% Cyclodextrin/PBS (40% Cyclodextrin, blau) oder mit 1mg/ml Vcpal in 40% Cyclodextrin/PBS (Vcpal, rot) behandelt. n = 10/12. Mittelwert ± SEM. *, p < 0,05.

Da sowohl die Behandlung mit 4-MU, als auch die Behandlung mit Vcpal *in vitro* zu einer reduzierten TAK1-Phosphorylierung führten, die mit einer erhöhten Apoptoserate einherging, wurden die NMRI^{nu/nu}-Mäuse mit A431 Xenografttumoren mit (5Z)-7-Oxozeaenol behandelt. Die Applikation erfolgte intraperitoneal. Auch hier wurde ein reduziertes Tumorstadium beobachtet, welches im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrollgruppe bereits nach der vierten Behandlung zu einer signifikant reduzierten Tumorstadium führte (Abbildung 21B).

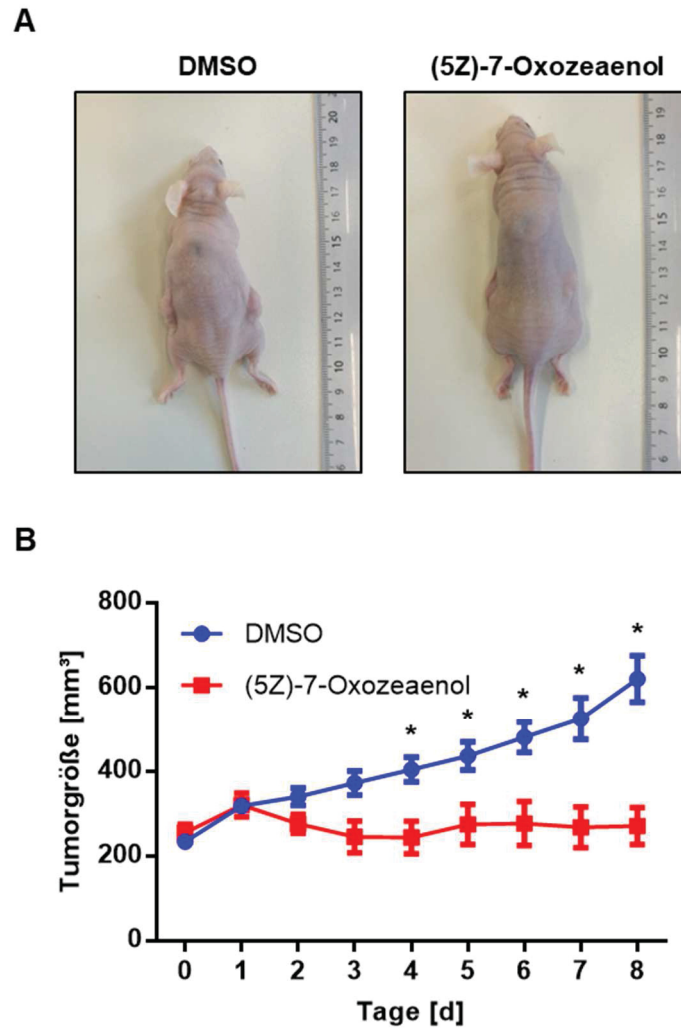


Abbildung 21: Inhibition von TAK1 reduziert das Wachstum von A431 Zellen im murinen Xenograftmodell.

A, Lichtbildaufnahmen der behandelten Mäuse nach 8tägiger Behandlung. **B**, Wachstumsverlauf der Tumore. NMR1^{nu/nu}-Mäuse wurden entweder mit DMSO (blau) oder mit 15 mg/kg Körpergewicht (5Z)-7-Oxozeaenol (rot) behandelt. n = 12/12. Mittelwert ± SEM. *, p < 0,05.

3.1.10. Expression von *HYAL1* korreliert mit der Phosphorylierung von TAK1 in Plattenepithelkarzinomen *in vivo*

Um die Relevanz im humanpathologischen Model zu bestätigen, wurden von der Dermatologie der Uniklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellte Proben untersucht. Dabei handelte es sich um Proben von Patienten mit einem Morbus Bowen oder mit einem Plattenepithelkarzinom der Haut der Stufe G1 oder G2. Die angefertigten immunhistologischen Schnitte wurden auf die Synthese der HA, Expression von *HYAL1* und Phosphorylierung von TAK1 untersucht. Die Detektion erfolgte mittels DAB (3,3'-Diaminobenzidin).

Zu Beginn wurde untersucht, ob die Expression von HYAL1 mit dem Grad der Erkrankung korreliert. Diesbezüglich konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Auch ein Zusammenhang zwischen Expression der HYAL1 und der HA Synthese wurde nicht beobachtet. So nahm das Signal der HA nicht bei zunehmenden HYAL1 Signal ab. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass das für die Färbung verwendete Hyaluronsäure-Bindeprotein (HAbP) in der Lage ist, auch sehr kleine Fragmente der HA zu binden. Sowohl bei einem M. Bowen, als auch bei einem PEK wurde beobachtet, dass die Tumorzellen eine stärkere Expression von HYAL1 aufwiesen als die umliegenden stromalen Zellen (Abbildung 22). *Vice versa* zeichneten sich die Stromazellen durch eine erhöhte Synthese der HA aus (Abbildung 22, PEK oberes Panel). Die Expression der HYAL1 korrelierte mit der Phosphorylierung von TAK1 am Ser412-Rest. In beiden Pathologien konnte beobachtet werden, dass bei einer starken Expression von HYAL1 die Aktivität von TAK1 zunahm (Abbildung 22, Vergleich zw. Oberes und unteres Panel der aufgeführten Pathologien). Hinweise darauf, dass diese Korrelation tumorspezifisch sein könnte, zeigen in der Dermis lokalisierte apokrine Drüsen, wie Talgdrüsen (schwarzer Stern) oder Schweißdrüsen (schwarzer Pfeil). Diese Gewebe wiesen ebenfalls eine starke *HYAL1*-Expression auf, die nicht zu einer gesteigerten Aktivität von TAK1 führten.

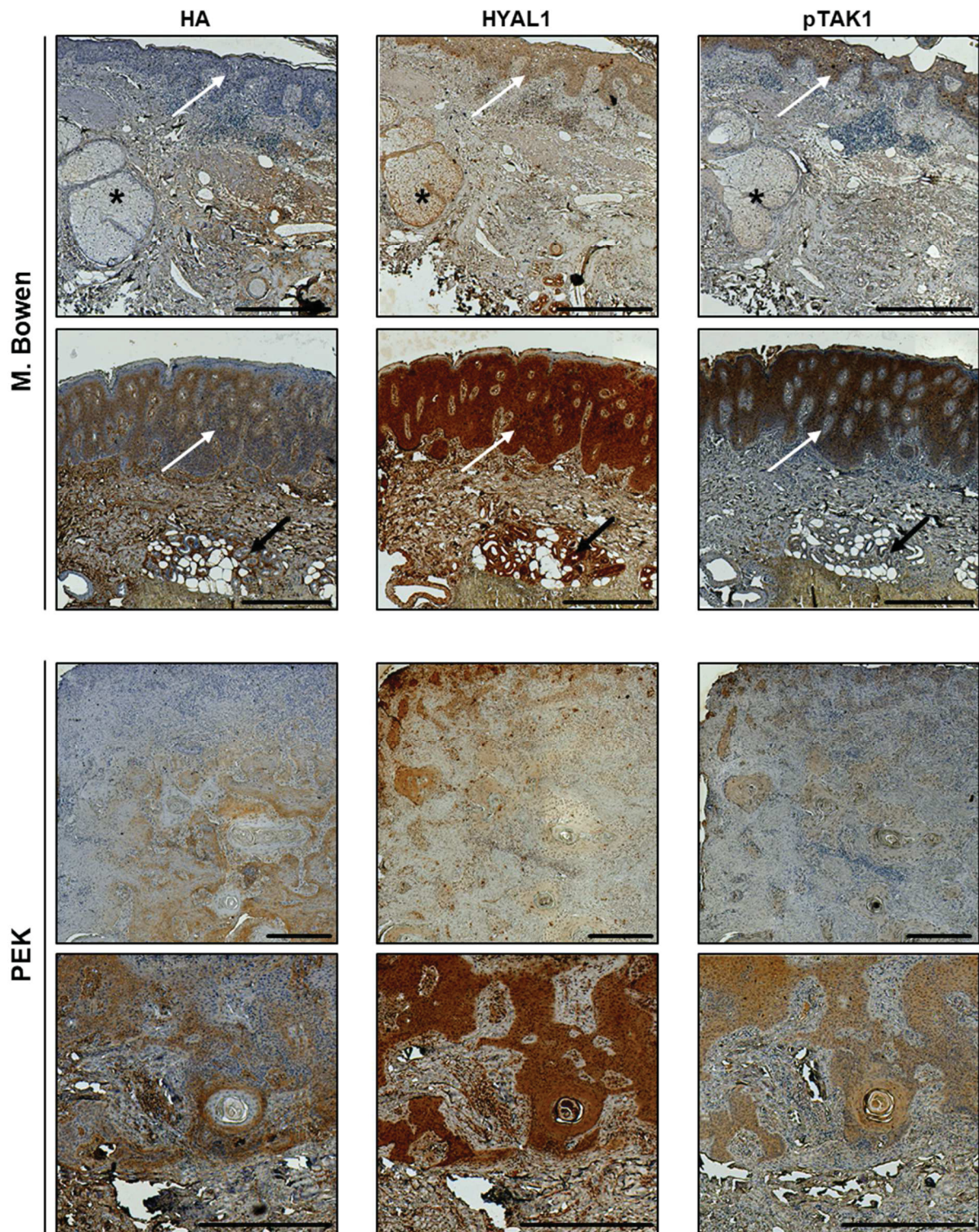
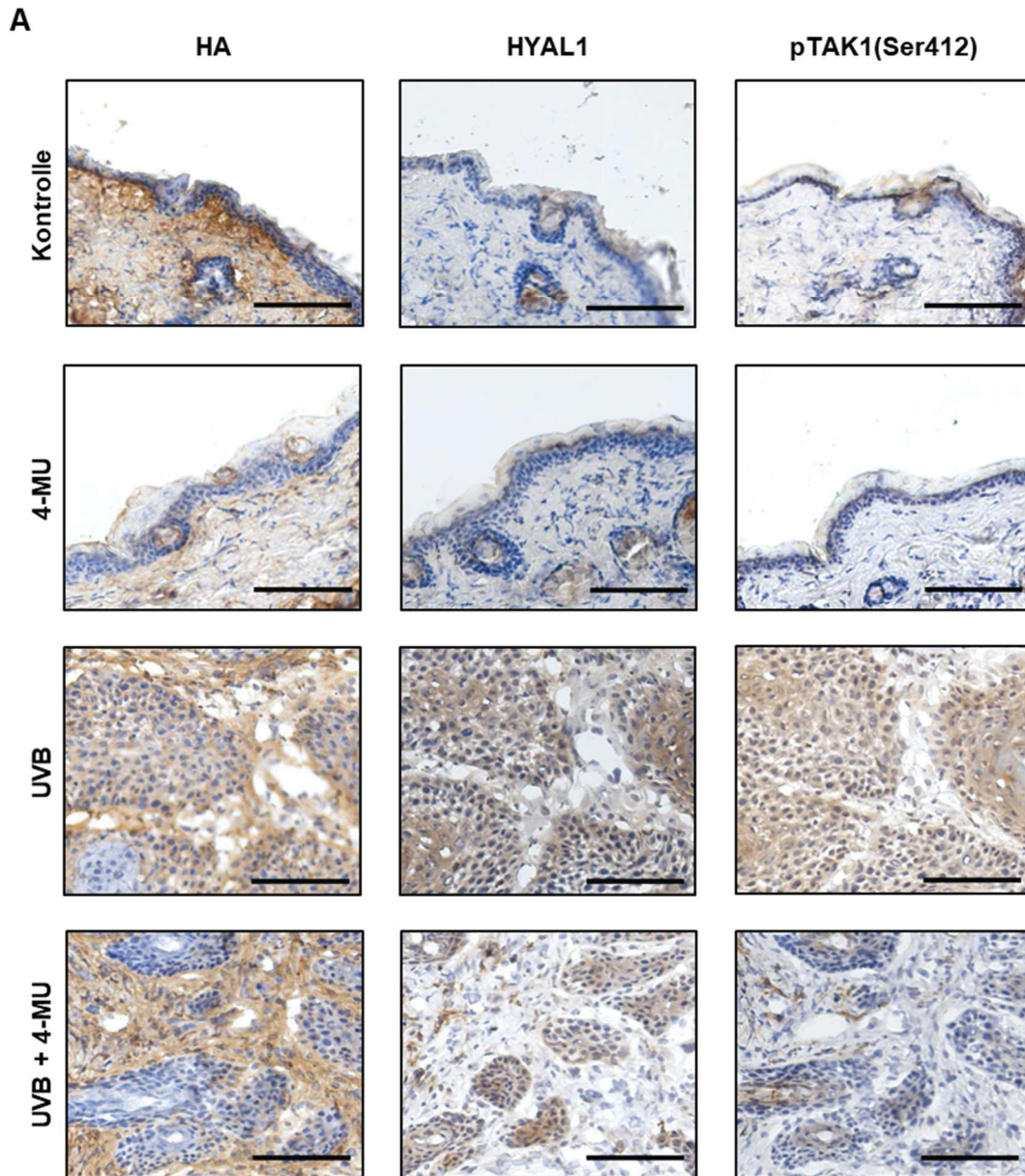


Abbildung 22: Die Phosphorylierung von TAK1 korreliert mit der Expression von HYAL1 in M. Bowen und Plattenepithelkarzinomen.

Immunohistochemische Färbung humaner Haut mit M. Bowens und Plattenepithelkarzinomen. Gefärbt wurde mittels DAB-Färbung HA, HYAL1 und Phosphorylierung von TAK1 am Ser412-Rest. Gezeigt wurden jeweils Schnitte mit einer niedrigen (jeweils oberes Panel) und hohen (jeweils unteres Panel) Expression von *HYAL1*. Weißer Pfeil = Region des M. Bowens. Schwarzer Pfeil = Schweißdrüsen. Schwarzer Stern = Talgdrüsen. Maßstabsbalken \triangleq 500 μ M.

3.1.11. 4-MU reduziert die Phosphorylierung von TAK1 *in vivo* im UV-induzierten Plattenepithelkarzinom

UV-Strahlung ist einer der größten Risikofaktoren des Plattenepithelkarzinoms der Haut. Es konnte gezeigt werden, dass die orale Applikation von 4-MU zu einer reduzierten Genese von Plattenepithelkarzinomen bei weiblichen SKH-1 Mäusen hat (Dr. Katharina Röck, unveröffentlicht). Am Endpunkt der von Dr. Katharina Röck durchgeführten Experimente wurden die Tumore entnommen und in TissueTek®-Einbettmedium (Leica Microsystems, Wetzlar) eingebettet. Histologische Schnitte wurden von Nikola Fuchs und David Rösgen angefertigt. Diese wurden im Anschluss mit Hilfe einer DAB-Färbung auf die Expression von *HYAL1*, die Synthese von HA und die Phosphorylierung von TAK1 am Ser412-Rest untersucht. Dabei wurden die Tumore mit gesunder Haut verglichen und die Intensität der Färbung kategorisiert (Abbildung 23B). Es wurde festgestellt, dass in der Dermis eine intermediäre Synthese der HA stattfand, die durch die orale Gabe von 4-MU im Futter reduziert wurde (Abbildung 23A und B). Die Phosphorylierung von TAK1 am Ser412 war nicht detektierbar und die Expression von *HYAL1* lediglich in drüsenartigem Gewebe ersichtlich. Beides war durch 4-MU nicht beeinflusst. In den UVB-induzierten Tumoren war sowohl im Tumor selbst, als auch im Stroma ein starkes Signal der HA zu beobachten, während die Expression von *HYAL1* und die Phosphorylierung von TAK1 auf den Tumor selbst beschränkt waren. Interessanterweise wurde durch die orale Gabe von 4-MU eine Reduktion der HA-Synthese im Tumor, aber nicht im Stroma erzielt. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Tumorregion stark reduziert war und das Stroma im Verhältnis zunahm. Auf die Expression der *HYAL1* hatte 4-MU keinen Einfluss. Jedoch wurde, wie es bereits in *in vitro* Experimenten gezeigt wurde, die Phosphorylierung von TAK1 durch 4-MU leicht reduziert (Abbildung 23A und B).



B

| | HA | HYAL1 | pTAK1(Ser412) |
|------------|-----|-------|---------------|
| Kontrolle | ++ | - | - |
| 4-MU | + | - | - |
| UVB | +++ | ++ | ++ |
| UVB + 4-MU | ++ | ++ | + |

Abbildung 23: Pharmakologische Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU reduziert die UVB-induzierte Tumorinduktion.

Weibliche SKH-1 Mäuse wurden über einen Zeitraum von 29 Wochen mit UVB-Strahlung behandelt und mit 4-MU oder 4-MU Kontrollfutter behandelt. Die Tumore wurden mittels DAB-Färbung **A**, auf HA, HYAL1 und Phosphorylierung von TAK1 am Ser412-Rest gefärbt und anschließend **B**, kategorisiert. Maßstabsbalken \cong 200 μ M.

3.1.12. Zusammenfassung I

In A431 Zellen ist in Vergleich zu NHEKs die Expression der *HYAL1* hochreguliert. Es konnte gezeigt werden, dass *HYAL1* eine wichtige Rolle für die anti-apoptotische Signalkaskade spielt. Der durch eine reduzierte Expression von *HYAL1* induzierte apoptotische Phänotyp ist dabei abhängig von der Aktivierung der Kinase TAK1, welche über die Phosphorylierung von I κ B α eine anti-apoptotische Antwort vermittelt. Wichtige Effektorgene dabei sind diverse IAPs (*Inhibitors of apoptosis*). Die Signalkaskade selbst scheint über die Aktivierung des TLR4 durch niedermolekulare HA gesteuert zu sein. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte eine Korrelation zwischen der Expression von *HYAL1* und der Aktivierung von TAK1 gezeigt werden. *In vitro* Experimente mit NHDFs und NHEKs und immunhistologische Färbungen humaner Plattenepithelkarzinome geben Hinweise darauf, dass dieser Mechanismus tumorspezifisch sein könnte. Dies erklärt, warum ausschließlich in A431 Zellen die reduzierte Expression von *HYAL1* zu einem apoptotischen Phänotyp führt. Auf die Proliferation, sowie auf die Motilität der Tumorzellen hat die Herabregulierung von *HYAL1* keine Wirkung.

3.2. Die Rolle der HA in der Interaktion zwischen Tumorzellen und mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind in fast allen Geweben des Körpers vorhanden, welche ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential aufweisen. Im Knochenmark sind diese für die Ausbildung der hämatopoetischen Nische verantwortlich. Eben diese kann von einer Großzahl von Tumoren ausgenutzt werden, um im Knochen Metastasen auszubilden. Das Potential, das Knochenmark zu infiltrieren und Metastasen auszubilden, scheint bei verschiedenen Tumorentitäten zu variieren. Die Infiltration des Knochenmarks kommt insbesondere bei einem primären Brusttumor, aber auch zum Beispiel bei Patienten mit Glioblastoma multiforme vor. Jedoch unterscheidet sich das Potential dieser beiden Entitäten, eine Metastase auszubilden, stark. Ob dabei die Interaktion mit den MSCs und gegebenenfalls die HA als Hauptbestandteil der EZM von Bedeutung ist, wurde im Folgenden untersucht.

3.2.1. Brusttumorzellen induzieren die HA-Synthese der MSCs

Um die Interaktion zwischen MSCs und Tumorzellen *in vitro* zu untersuchen, wurden die Zelllinien MCF-7 (epitheliales, nicht invasives Mammakarzinom), MDA-MB-231 (mesenchymales, hoch invasives Mammakarzinom) und U87-MG (mesenchymales, invasives Glioblastoma multiforme) verwendet. Bei den MSCs handelt es sich um Primärisolate von Knochenmarkspendern und werden im Folgendem als Knochenmark-isolierte mesenchymale Stammzellen bezeichnet (bmMSC).

Zu Beginn wurde das Wachstumsverhalten der Tumorzellen bestimmt und der Überstand bezüglich des pHs und der verbrauchten Glukose untersucht. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Wachstumsverhalten, pH-Veränderung und die Menge der verbrauchten Glukose im Überstand (Abbildung 38). Nachdem das Medium über einen Zeitraum von 72 h durch die Tumorzelllinien konditioniert wurde, wurde der Überstand entnommen und die verbrauchte Glukose substituiert.

Die bmMSCs wurden im entsprechenden Kultivierungsmedium ausgesät, welches nach 24 h durch den Überstand ersetzt wurde. Nach weiteren 72 h wurde der HA Gehalt im Überstand bestimmt. Der HA Gehalt des Überstands, nach Inkubation auf den Tumorzellen, wurde als Basiswert vom ermittelten Wert subtrahiert, um lediglich die Menge der von den bmMSCs sezernierten HA zu ermitteln. Der durch die Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 generierte Überstand führte hierbei zu einem signifikant höheren HA Gehalt (Abbildung 24A). Dieses Ergebnis konnte durch zytochemische Färbungen der HA validiert werden (Abbildung 24B).

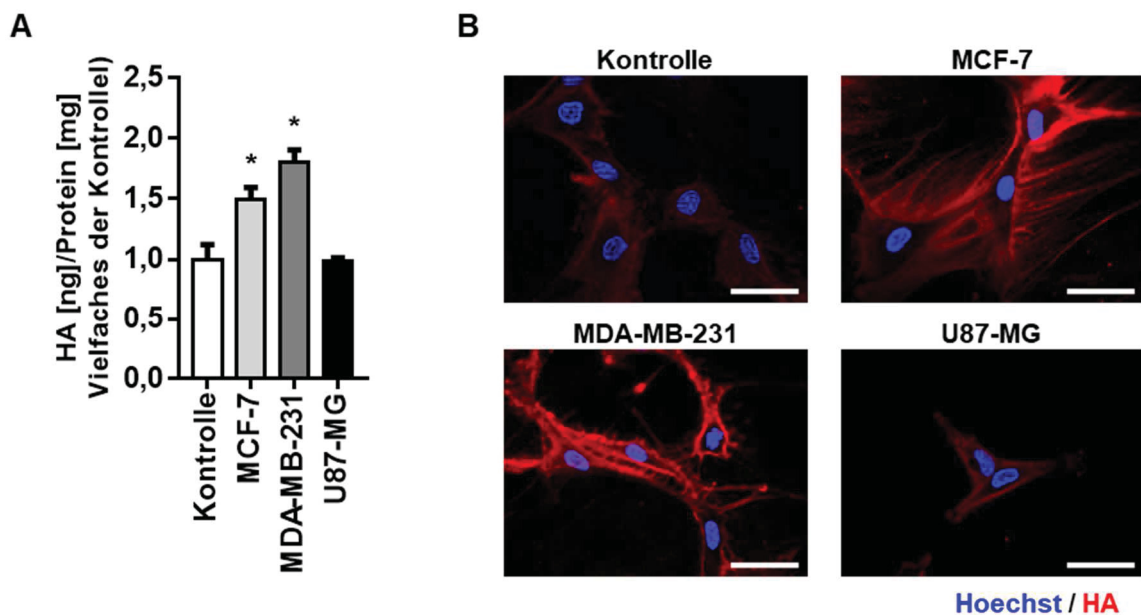


Abbildung 24: Durch Mammakarzinomzellen konditionierter Überstand steigert die HA-Synthese in bmMSCs.

BmMSCs wurden 72 h mit den Überständen von MCF-7, MDA-MB-231 und U87-MG Zellen inkubiert. **A**, Der HA-Gehalt im Überstand wurde mittels Hyaluronic Acid Test Kit (Corgenix, Colorado) quantifiziert und auf den Proteingehalt der lysierten Zellen normalisiert. Der HA-Gehalt des Überstandes direkt nach der Generierung wurde vom Ergebnis subtrahiert. **B**, Zytochemische Färbung der HA (rot). Nuklei wurden mit Hoechst33342 (blau) angefärbt. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM. *, $p < 0,05$. Maßstabsbalken $\cong 50 \mu\text{M}$.

Die Induktion der HA-Synthese durch Mammakarzinom-Zellen konnte auch *in vitro* in einem Kokultur-Experiment gezeigt werden. Dafür wurden bmMSCs mit MCF-7, MDA-

MB-231 oder U87-MG Zellen jeweils in derselben Lochung einer Multititerplatte kultiviert. Zur Unterscheidung der Zellen wurden die Tumorzellen zuvor mit CFSE markiert. Neben dem erhöhten HA-Signal der MSCs in Kokultur mit MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen war die Lokalisierung der Tumorzellen auffällig. In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war zu erkennen, dass die mesenchymalen Tumorzelllinien MDA-MB-231 und U87-MG auf den MSCs lokalisiert waren, während die MCF-7-Zellen meist von den bmMSCs separiert vorlagen (Abbildung 25A). Ob diese Interaktion über die HA vermittelt sein könnte, wurde mittels qRT-PCR die Expression von mit HA interagierenden Rezeptoren überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression der Rezeptoren *CD44*, *LAYILIN* und *RHAMM* in den mesenchymalen Tumorzelllinien MDA-MB-231 und U87-MG signifikant im Vergleich zu der epithelialen Zelllinie MCF-7 erhöht war (Abbildung 25B).

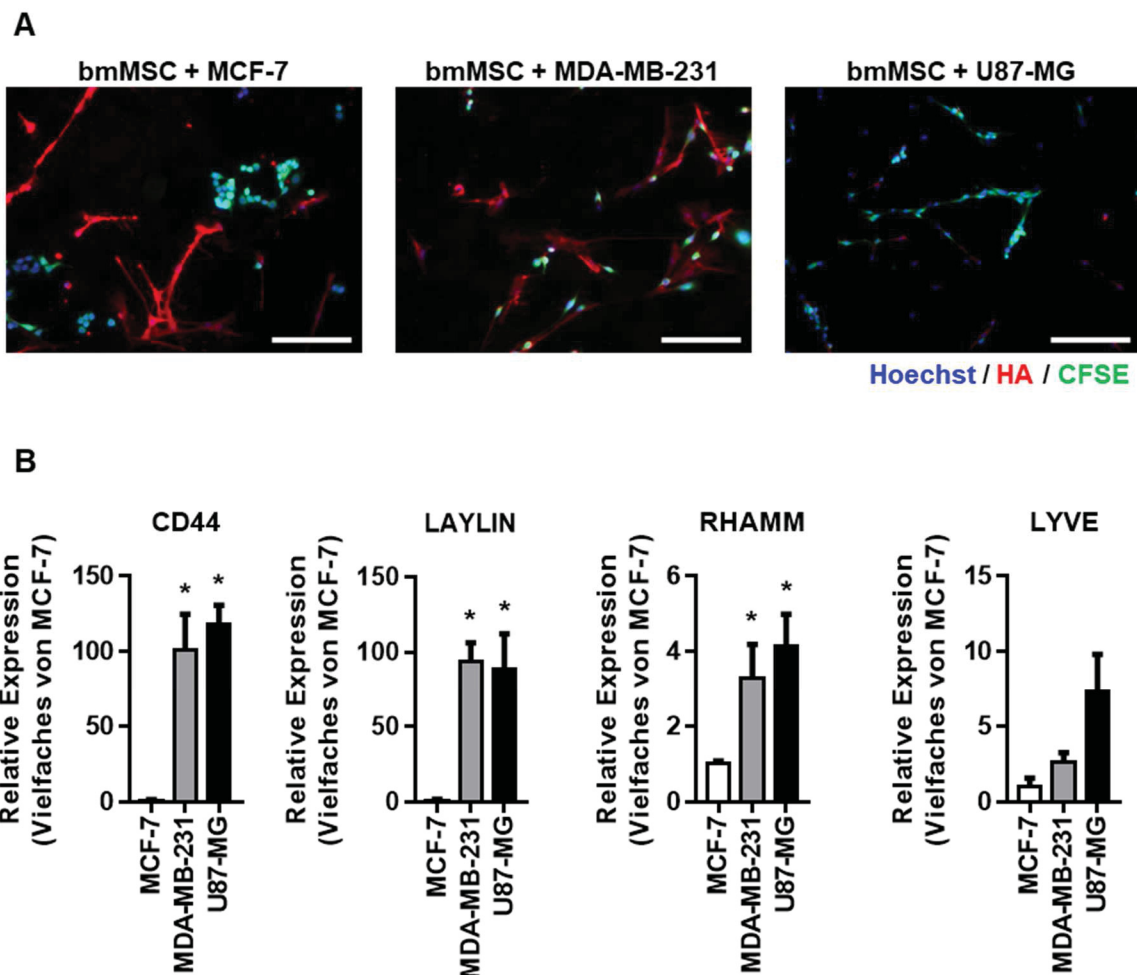


Abbildung 25: Mesenchymale Tumorzellen interagieren eng mit bmMSCs.

A, Kokultur zwischen bmMSCs und den Tumorzelllinien MCF-7, MDA-MB-231, und U87-MG. Die Tumorzelllinien wurden zuvor mit CFSE (grün) markiert. Die Kernfärbung erfolgte durch Hoechst 33342 (blau) und die HA wurde mittels HAbP (rot) markiert. **B**, Semiquantitative Bestimmung der

Expression der Gene *CD44*, *LAYLIN*, *RHAMM* und *LYVE*. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM. *, $p < 0,05$ verglichen mit MCF-7. Maßstabsbalken $\cong 50 \mu\text{M}$.

3.2.2. Einfluss der MSCs auf die Motilität von Tumorzellen

Mesenchymale Stammzellen sind ein sehr wichtiger Bestandteil des Stromas eines Tumors. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass diese an der Regulation der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt sind, die von einer gesteigerten Motilität begleitet wird. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine gesteigerte Motilität auch bei den Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U87-MG nachgewiesen werden kann. Dazu wurden sowohl die bmMSCs, als auch die Tumorzellen in Monokultur oder in einer Kokultur kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen mittels Zeitraffer-Mikroskopie untersucht und die akkumulierte Distanz über einen Zeitraum von weiteren 24 h manuell bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die untersuchten Tumorzellen keinen Einfluss auf die Motilität der Stammzellen haben (Abbildung 26A und B).

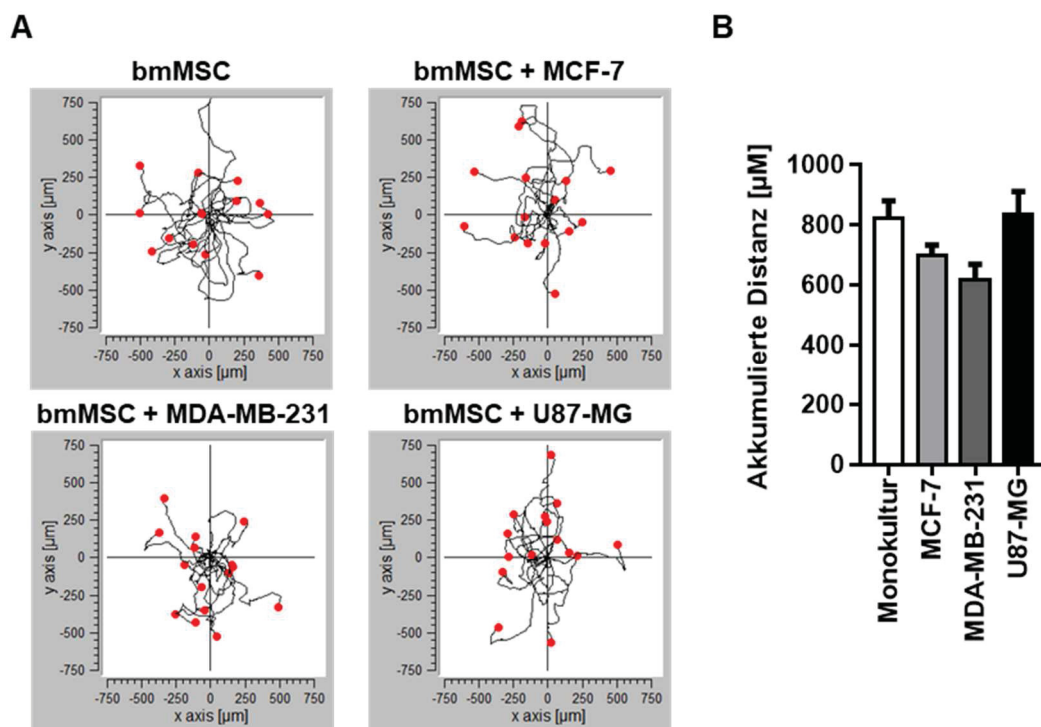


Abbildung 26: Die Tumorzelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U87-MG haben keinen Einfluss auf die Motilität von bmMSCs.

Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 h analysiert **A**, Graphische Darstellung der akkumulierten Distanz einzelner analysierter Zellen. Dabei stellen die roten Punkte den Abstand zum Ausgangspunkt (0/0) und die schwarzen Striche den Verlauf der Zellen. **B**, Quantifizierung der akkumulierten Distanz. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM.

Des Weiteren wurde der Einfluss der bmMSCs auf die Motilität der Tumorzellen untersucht und mit der jeweiligen Motilität der Tumorzellen in Monokultur verglichen. Dabei zeigte sich, dass die mesenchymalen Tumorzellen MDA-MB-231 und U87-MG in

Monokultur eine höhere Motilität aufwiesen, als die epitheliale Zelllinie MCF-7 (Abbildung 27A und B). Es konnte kein Einfluss der bmMSCs auf die Motilität der Zelllinien MCF-7 und U87-MG beobachtet werden. Jedoch war die Motilität der Zellen MDA-MB-231 in Kokultur mit bmMSCs signifikant reduziert im Vergleich zur Monokultur (Abbildung 27A und B).

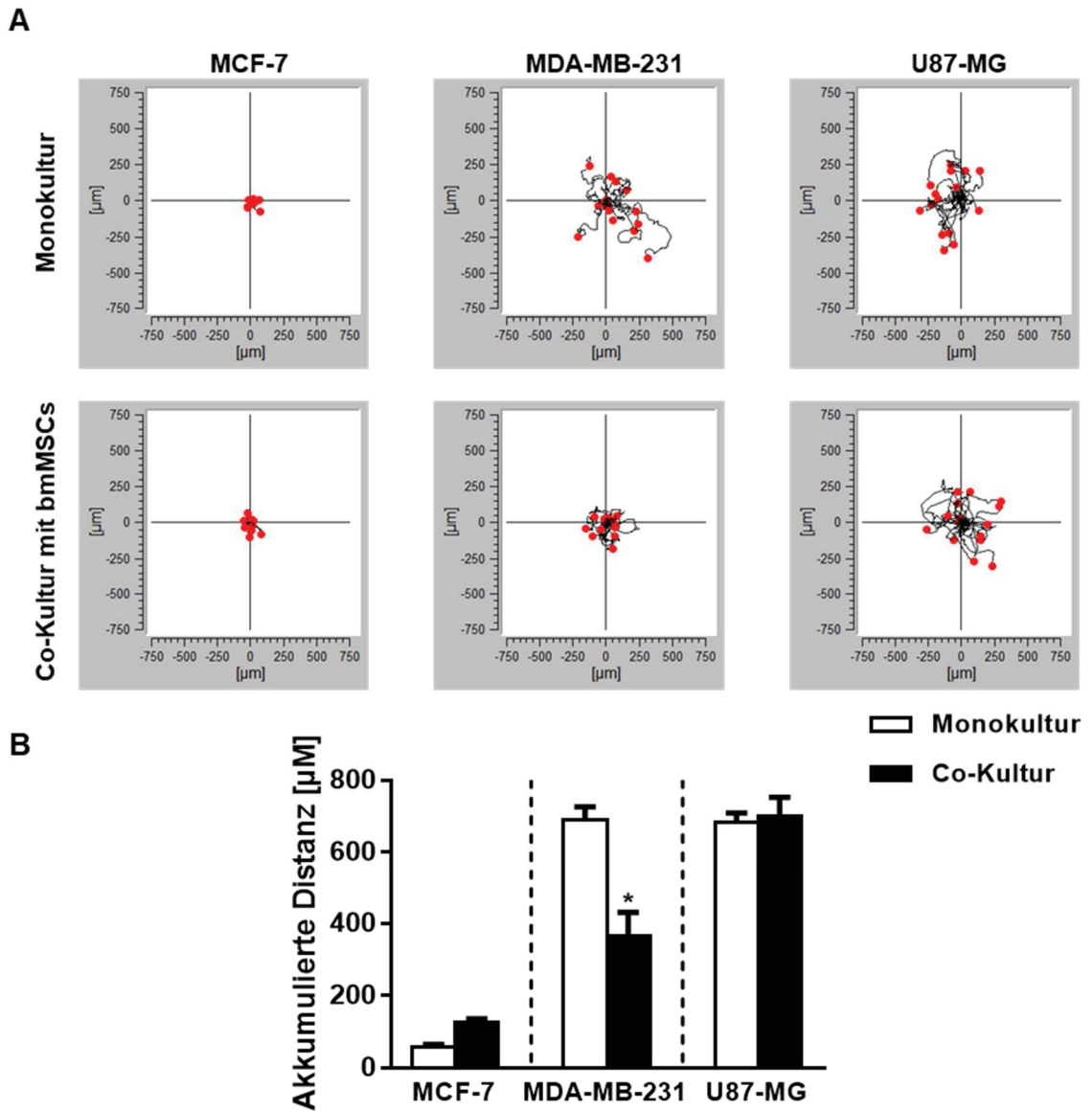


Abbildung 27: BmMSCs reduzieren die Motilität der Zelllinie MDA-MB-231.

Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 h analysiert **A**, Graphische Darstellung der akkumulierten Distanz einzelner analysierter Zellen. Dabei stellen die roten Punkte den Abstand zum Ausgangspunkt (0/0) und die schwarzen Striche den Verlauf der Zellen.

3.2.3. Inhibition der HA induziert die adipogene Differenzierung der bmMSCs

Ein wichtiges Merkmal der bmMSCs ist ihre Pluripotenz. Das bedeutet, dass diese Zellen in der Lage sind, in unterschiedliche mesodermale Zelltypen zu differenzieren, wie z. B. Osteoblasten oder Adipozyten. Da die HA-Matrix der bmMSCs durch die Mammakarzinom-Zellen moduliert wurde, wurde im nächsten Schritt der Einfluss der HA auf das Differenzierungspotential der MSCs untersucht. Dafür wurden die MSCs in Ab- und Anwesenheit von 300 μ M 4-MU für 28 Tage adipogen und osteogen differenziert.

Im Falle der osteogenen Differenzierung wurden die auf der Zelloberfläche abgelagerten Calciumphosphate mittels Alizarin S angefärbt (Abbildung 28A, oben). Zur Quantifizierung wurde die Ca^{2+} -Konzentration der Zellen bestimmt (Abbildung 28A, unten). Sowohl die Alizarin S Färbung, als auch die Ca^{2+} -Konzentration zeigten keinen Einfluss von 4-MU auf die osteogene Differenzierung (Abbildung 28A).

Zum Nachweis der adipogenen Differenzierung wurden die Lipidvesikel im Inneren der zu Adipozyten differenzierten MSCs mit Hilfe von Öl Rot O angefärbt (Abbildung 28B, oben) und mikroskopisch quantifiziert (Abbildung 28B unten). Hier konnte gezeigt werden, dass 4-MU die adipogene Differenzierung signifikant gesteigert hat.

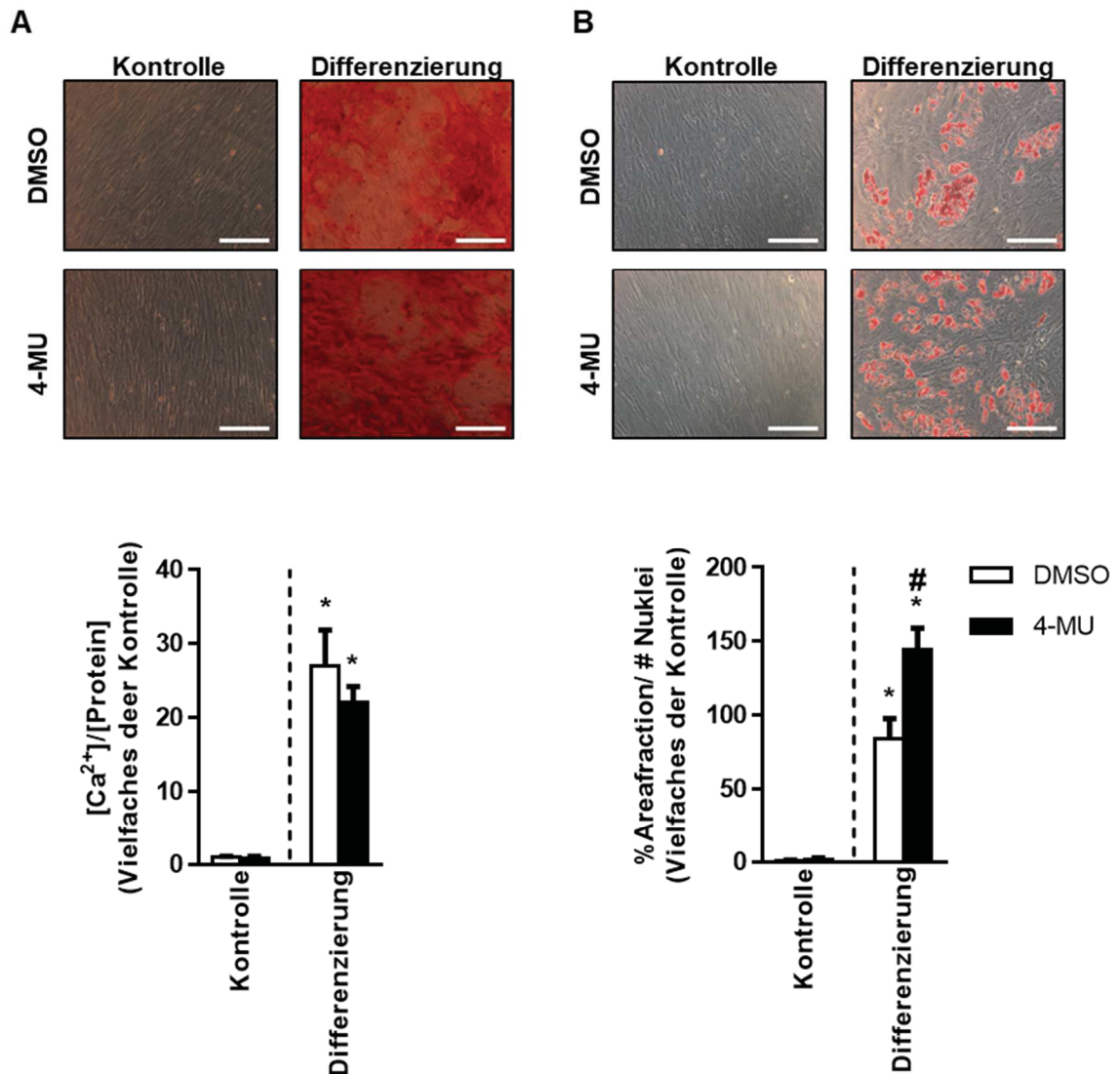


Abbildung 28: 4-MU steigert die adipogene Differenzierung der bmMSCs.

BmMSCs wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen osteogen, sowie adipogen differenziert und simultan mit 300 μM 4-MU behandelt. **A**, Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Alizarin S gefärbten Zellen nach osteogener Differenzierung (oben) und die Quantifizierung mittels Quantifizierung der Ca^{2+} -Konzentration (unten). **B**, Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Öl Rot O gefärbten Zellen nach adipogener Differenzierung (oben) und die Quantifizierung durch die Bestimmung der *Areafraction* (unten). $n = 4$. Mittelwert \pm SEM. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. #, $p < 0,05$ im Vergleich zur Differenzierung. Maßstabsbalken $\cong 50 \mu\text{M}$.

3.2.4. MDA-MB-231 Zellen inhibieren die adipogene Differenzierung der bmMSCs

Da der Überstand der Mammakarzinom-Zellen Einfluss auf die HA-Synthese der bmMSCs hatte, wurden die bmMSCs im Tumorüberstand adipogen und osteogen differenziert und zusätzlich mit 4-MU behandelt.

Nach Färbung mit Alizarin S konnte keine Veränderung der osteogenen Differenzierung durch eine der verwendeten Tumor-Zelllinien beobachtet werden (Abbildung 29A). Dies

wurde durch die Messung der Ca^{2+} -Konzentration bestätigt (Abbildung 29B). Auch die simultane Applikation von 4-MU, während des gesamten Versuches, hatte keinen Einfluss auf die osteogene Differenzierung.

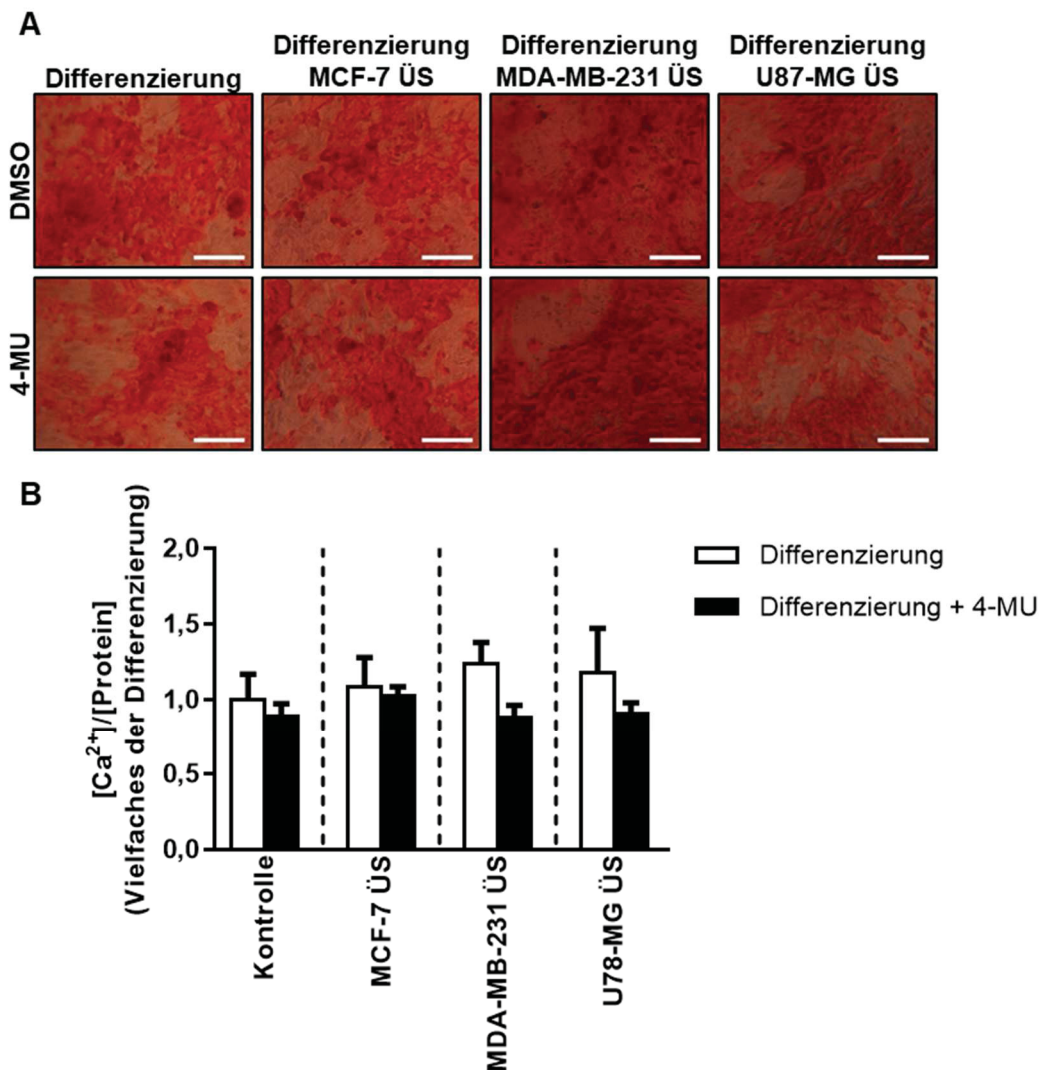


Abbildung 29: Die osteogene Differenzierung wird nicht von Tumorüberständen beeinflusst.

BmMSCs wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen osteogen differenziert und dabei in von MCF-7, MDA-MB-231 und U87-MG Zellen konditioniertem Überstand inkubiert. Zeitgleich wurden die Zellen mit 300 μM 4-MU behandelt. **A**, Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Alizarin S Färbung nach 28 Tagen. **B**, Quantifizierung der osteogenen Differenzierung mittels Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM. Maßstabsbalken \cong 50 μM .

Bezüglich der adipogenen Differenzierung konnte festgestellt werden, dass diese durch den Überstand von MCF-7 und U87-MG nicht signifikant verändert wurde (Abbildung 30B, Balken 3 und 7). Im Falle des durch MCF-7 konditionierten Mediums war eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung durch die simultane Applikation von 4-MU zu beobachten (Abbildung 30B, Balken 4). Interessanterweise war die adipogene Differenzierung durch den Überstand von MDA-MB-231 Zellen (invasive

Mammakarzinom-Zelllinie) signifikant reduziert (Abbildung 30B, Balken 5). Dieser negative Einfluss auf das adipogene Differenzierungspotential konnte durch die simultane Gabe von 4-MU aufgehoben werden (Abbildung 30B, Balken 6).

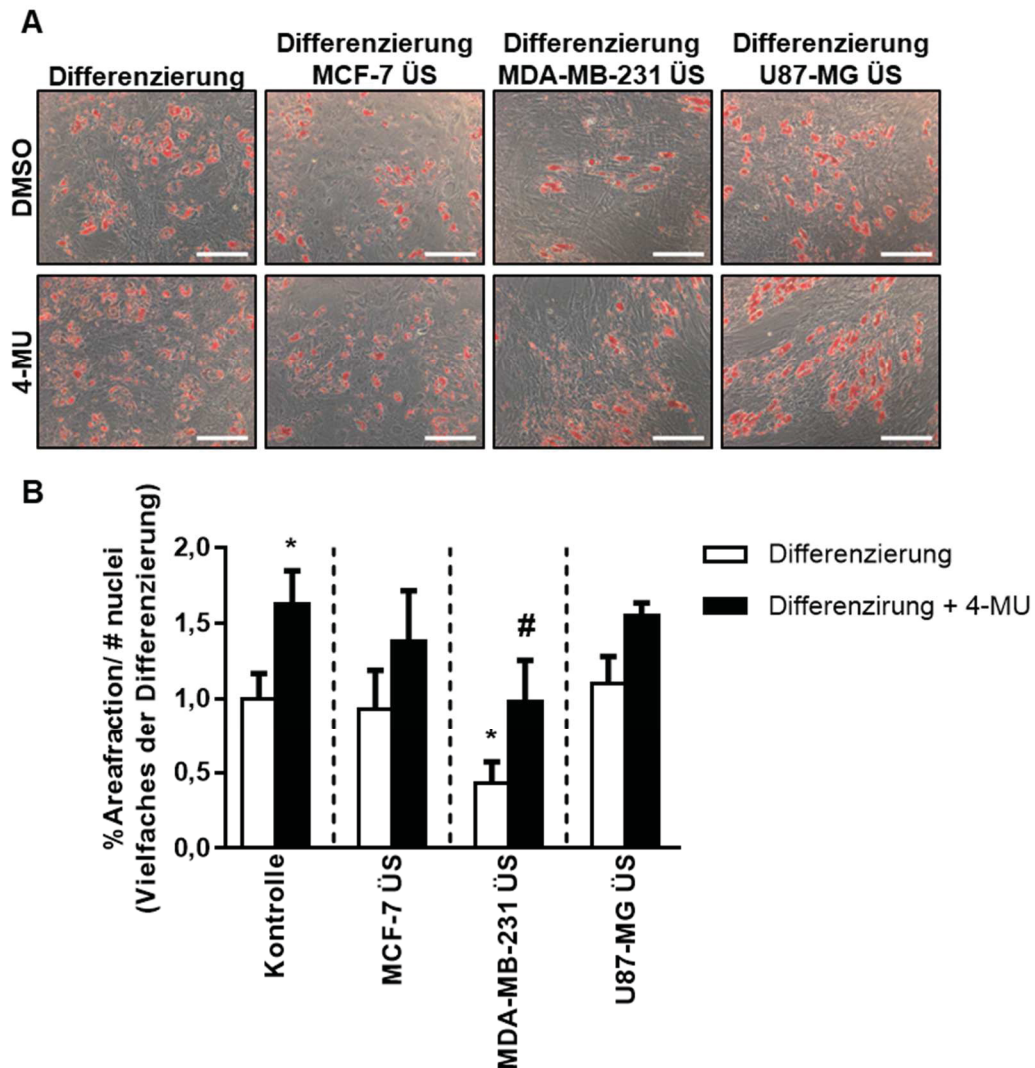


Abbildung 30: Die invasive Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 inhibiert die adipogene Differenzierung der bmMSCs.

BmMSCs wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen adipogen differenziert und dabei in von MCF-7, MDA-MB-231 und U87-MG Zellen konditioniertem Überstand inkubiert. Zeitgleich wurden die Zellen mit 300 μ M 4-MU behandelt. **A**, Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Öl Rot O Färbung nach 28 Tagen. **B**, Quantifizierung der adipogenen Differenzierung mittels mikroskopischer Bestimmung der *Areafraction*. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM. Maßstabsbalken \cong 50 μ M.

3.2.5. Einfluss adipogen differenzierter bmMSCs auf Tumorzellen

Es konnte bewiesen werden, dass bmMSCs an der Tumorprogression beteiligt sind. So wurde beobachtet, dass bmMSCs in der Lage sind, EMT in den Tumorzellen zu induzieren und die Proliferation der Tumorzellen zu steigern. Da in Kapitel 3.2.1 gezeigt

wurde, dass insbesondere mesenchymale Tumorzellen, wie MDA-MB-231 und U87-MG stark *in vitro* mit bmMSCs interagieren, sollte der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss eine adipogene Differenzierung auf diese Interaktion hat. Dazu wurden bmMSCs über einen Zeitraum von 28 Tagen differenziert und im Anschluss mit CFSE-gefärbte Tumorzellen kokultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und mit Öl Rot O gefärbt, um differenzierte von nativen bmMSCs zu unterscheiden. Dabei fiel auf, dass sich die Tumorzellen vermehrt in den Bereichen ansiedelten, in denen die bmMSCs nicht differenziert waren (Abbildung 31A). Dabei wurde bei allen getesteten Tumorzelllinien eine auf adipogen differenzierten bmMSCs signifikant reduzierte Anzahl an Tumorzellen ermittelt im Vergleich zu nativen bmMSCs (Abbildung 31B).

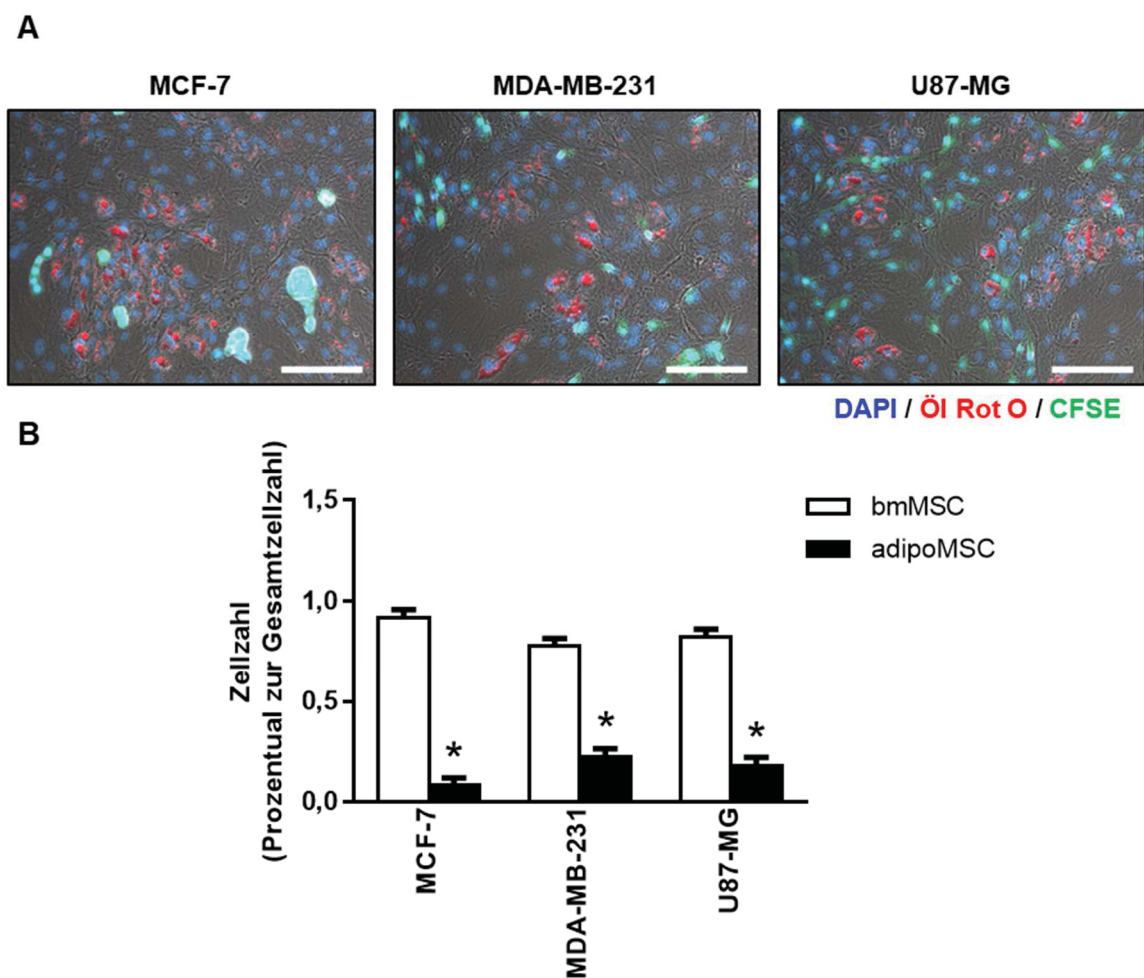


Abbildung 31: Einfluss einer adipogenen Differenzierung auf die bmMSC-Tumorzell-Interaktion.

BmMSCs wurden über einen Zeitraum von 28 d adipogen differenziert und im Anschluss mit Tumorzellen kokultiviert. **A**, Mikroskopische Aufnahmen adipogen differenzierter bmMSCs mit dem Tumorzelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U87-MG. Die Tumorzellen wurden mit CFSE (grün) markiert. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst33342 (blau). Differenzierte bmMSCs wurden mit Öl Rot O (rot) markiert. **B**, Quantifizierung bei der die Anzahl der Tumorzellen bestimmt wurde, die entweder mit undifferenzierten oder adipogen differenzierten bmMSCs colokalisieren. n = 4. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05, Maßstabsbalken \pm 50 μ M

Um den Einfluss adipogen differenzierter MSCs (adipoMSCs) auf die proliferative Rate der Tumorzellen zu überprüfen, wurden bmMSCs erneut über einen Zeitraum von 28 d differenziert. Im Anschluss wurde das Medium der bmMSCs durch DMEM *low glucose* (1g/l) ersetzt und für weitere 3 d inkubiert. CFSE markierte Tumorzellen wurden im Folgenden in dem von adipoMSCs konditioniertem Medium, aber auch in dem von nativen bmMSCs, kultiviert und die proliferative Rate mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei ergab sich, dass in diesem Versuchsaufbau keine proliferationsfördernde Eigenschaft der bmMSCs gezeigt werden konnte im Vergleich zu nicht konditioniertem Medium. Allerdings war die Proliferation der Mammakarzinomzellen reduziert, wenn diese im konditioniertem Medium der adipoMSCs kultiviert wurden (Abbildung 32A und B).

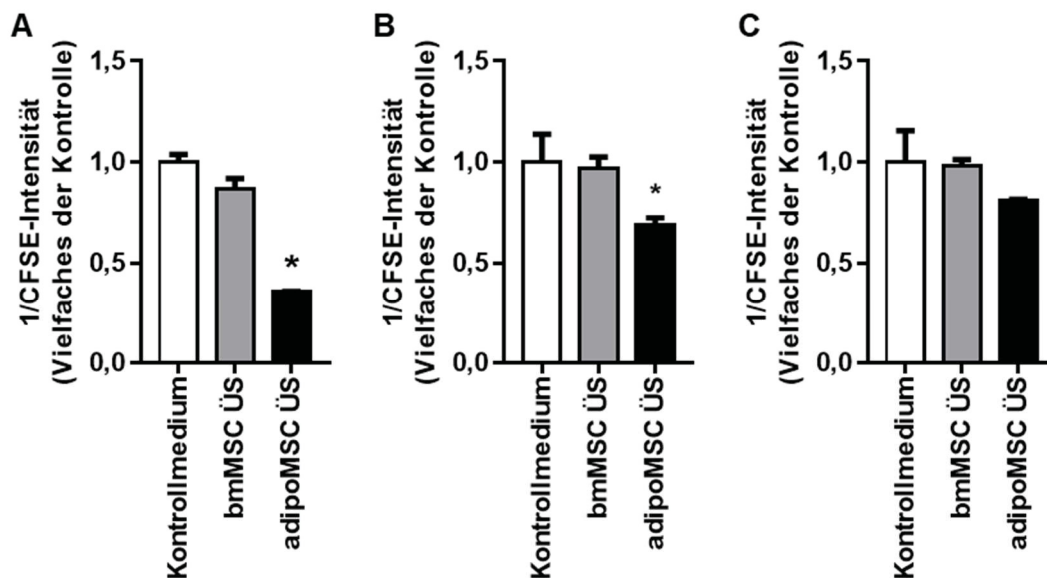


Abbildung 32: Überstand von adipoMSCs reduziert die Proliferation von Mammakarzinomzellen.

BmMSCs wurden über einen Zeitraum von 28 d adipogen differenziert. Kontrollbehandelte MSCs und adipoMSCs wurden im Anschluss für weitere 3 d in DMEM *low glucose* inkubiert. Die Zelllinien **A**, MCF-7, **B**, MDA-MB-231 und **C**, U87-MG wurden mit CFSE markiert und für 3 d in MSCs konditioniertem Medium kultiviert. Unbehandeltes Medium diente als Kontrolle. n = 3. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05.

3.2.6. Adipogen differenzierte MSCs verlieren ihr immunmodulatorisches Potential

BmMSCs haben ein hohes immunmodulatorisches Potential, indem Sie die Proliferation zytotoxischer T-Zellen hemmen. Auf die Proliferation regulatorischer T-Zellen wiederum haben bmMSCs einen positiven Einfluss. Im murinen Modell konnte bereits gezeigt werden, dass das immunmodulatorische Potential durch adipogene Differenzierung reduziert ist. Dies sollte für die in dieser Arbeit verwendeten, humanen, primären bmMSCs bestätigt werden.

In einem ersten Schritt wurde der Einfluss der adipogenen Differenzierung auf das immunmodulatorische Potential untersucht. Dafür wurden die Zellen über einen Zeitraum von 10 d differenziert. Zeitgleich wurden die Zellen mit 300 μ M 4-MU behandelt. Nach der Differenzierung wurden aktivierte und mit CFSE markierte T-Zellen auf die bmMSCs gegeben und die Anzahl der proliferierenden T-Zellen ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die auf bmMSCs ausgesäten T-Zellen eine reduzierte Proliferation aufwiesen (Abbildung 33A, Balken 2). Diese Reduktion spiegelt das inhibitorische Potential der in diesem Versuch verwendeten bmMSCs wieder. Unterliefen die bmMSCs eine adipogene Differenzierung, war die Anzahl der proliferierenden T-Zellen wiederum signifikant erhöht (Abbildung 33A, Balken 3). Dieser Effekt konnte durch die zeitgleiche Behandlung mit 4-MU signifikant gesteigert werden. Die alleinige Behandlung der bmMSCs mit 4-MU hatte keinen Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen (Abbildung 33A, Balken 4).

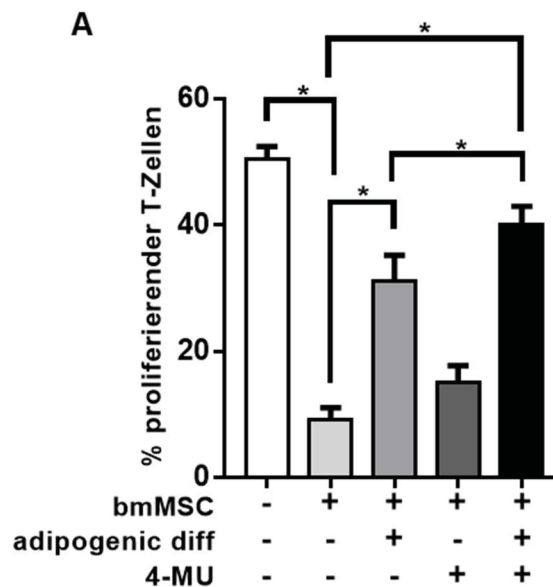


Abbildung 33: Adipogene Differenzierung der bmMSCs reduziert den immunmodulatorischen Effekt und führt zu einer vermehrten T-Zell Proliferation.

A, BmMSCs wurden über einen Zeitraum von 10 d in An- und Abwesenheit von 300 μ M 4-MU adipogen differenziert. Im Anschluss wurden aktivierte, mit CFSE gefärbte T-Zellen für 6 d auf den bmMSCs kultiviert. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte mittels Durchflusszytometrie. n = 4. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05.

In einem weiteren Ansatz wurde der Einfluss von durch Tumorzellen konditioniertem Medium auf die T-Zell Proliferation untersucht. Dazu wurden die bmMSCs über 10 d mit konditioniertem Medium behandelt und auch differenziert. Wichtig ist dabei zu erwähnen, dass nachdem die T-Zellen auf die bmMSCs gegeben wurden, bei allen Bedingungen das Medium durch unbehandeltes RPMI1640-Medium ersetzt wurde. Dadurch waren die

Kultivierungsbedingungen in Bezug auf das Kultivierungsmedium der aller T-Zellen gleich.

Die signifikante Reduktion der Proliferation der T-Zellen zeigte dabei erneut das inhibitorische Potential der bmMSCs auf die Proliferation der T-Zellen. Die Behandlung der MSCs mit MDA-MB-231 (Abbildung 34A, Balken 4) und U87-MG (Abbildung 34A, Balken 8) konditioniertem Medium hatte keinen signifikanten Einfluss auf die T-Zell Proliferation. Auch die adipogene Differenzierung in MDA-MB-231 konditioniertem Überstand führte zu keinem signifikanten Anstieg der T-Zell Proliferation (Abbildung 34A, Balken 5) verglichen mit nativen MSCs. Die simultane Applikation von 4-MU hatte wie schon zuvor in Abbildung 33 einen negativen Einfluss auf das immunmodulatorische Potential der bmMSCs und führte zu einer vermehrten Proliferation der T-Zellen (Abbildung 34A, Balken 7). Die proliferative Rate der T-Zellen, auf in U87-MG konditionierten Überstand inkubierten und adipogen differenzierten bmMSCs (Abbildung 34A, Balken 9), war vergleichbar mit den T-Zellen, welche auf unter Kontrollbedingungen differenzierten bmMSCs kultiviert wurden waren (Abbildung 34A, Balken 3).

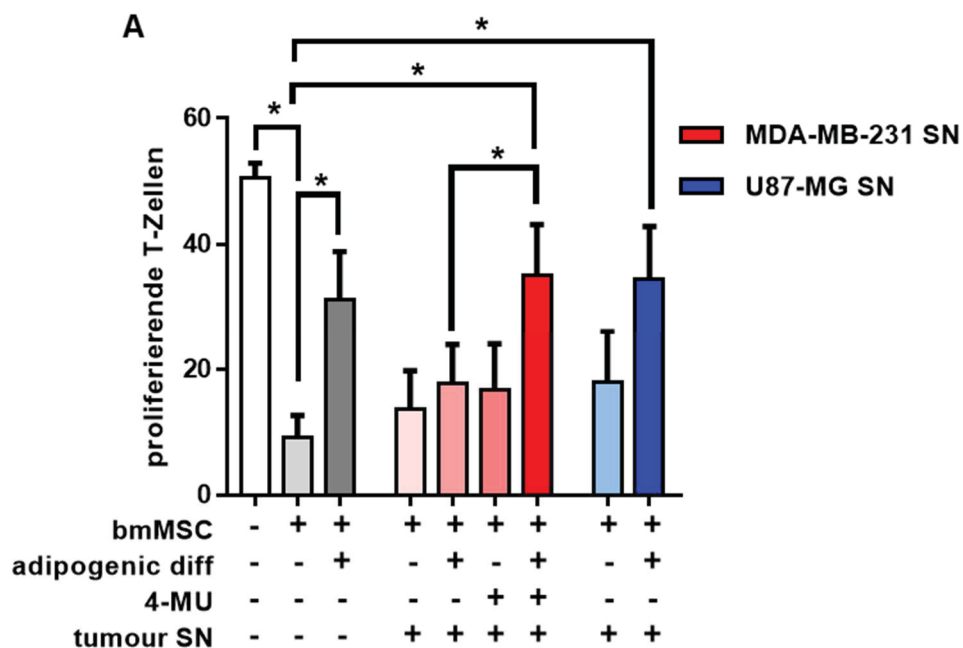


Abbildung 34: MDA-MB-231 konditioniertes Medium erhält das immunmodulatorische Potential von bmMSCs.

A, BmMSCs wurden über einen Zeitraum von 10 d in tumorkonditioniertem Medium inkubiert, adipogen differenziert und mit 300 μ M 4-MU behandelt. Im Anschluss wurden aktivierte, mit CFSE gefärbte T-Zellen für 6 d auf den bmMSCs kultiviert. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten. n = 4. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05.

Aufgrund der in Abbildung 34 und Abbildung 29 gezeigten Ergebnisse schien der Einfluss der Tumorzellen auf das immunmodulatorische Potential davon abhängig zu

sein, wie diese die adipogene Differenzierung der bmMSCs regulieren. Daher wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt, in der die Proliferation der T-Zellen mit dem Grad der adipogenen Differenzierung verglichen wurde.

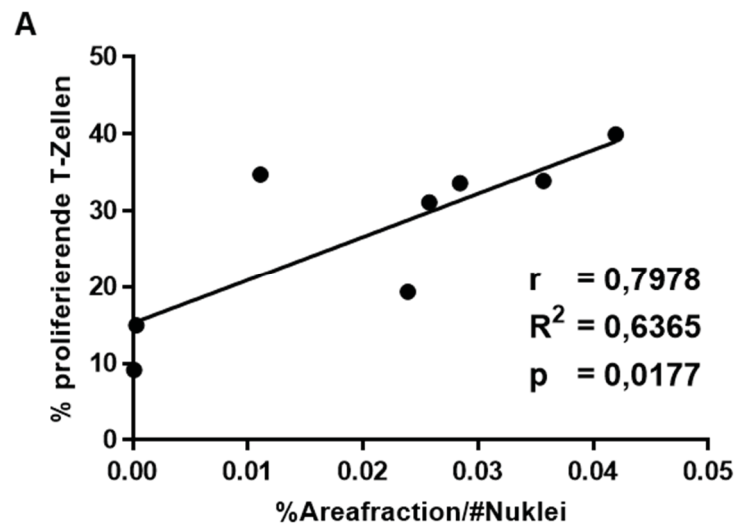


Abbildung 35: Das immunmodulatorische Potential der bmMSCs korreliert mit dem Grad der adipogenen Differenzierung.

A, Durchführung einer Korrelationsanalyse nach Pearson, bei der untersucht wurde, ob das immunmodulatorische Potential der MSCs (dargestellt als % proliferierender T-Zellen) mit dem Grad der adipogenen Differenzierung (dargestellt als % Areafraction/#Nuklei) korreliert.

Die Analyse ergab, dass die Anzahl der proliferierenden T-Zellen und der Grad der adipogenen Differenzierung positiv miteinander korrelieren. Der Korrelationskoeffizient r betrug dabei 0,7978, bei einem Bestimmtheitsmaß von 63,65% (Abbildung 35A).

3.2.7. Zusammenfassung II

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die invasive Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 im Gegensatz zu den Zelllinien MCF-7 und U87-MG die adipogene Differenzierung der bmMSCs inhibiert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Tumorzellen stärker mit undifferenzierten bmMSCs co-lokalisieren, als mit adipoMSCs. Die enge Interaktion insbesondere zwischen bmMSCs und mesenchymalen Tumorzellen könnte über die HA vermittelt sein, da in den Zelllinien MDA-MB-231 und U87-MG die mit HA-interagierenden Rezeptoren im Vergleich zur Zelllinie MCF-7 hochreguliert waren. Die adipogene Differenzierung der bmMSCs wurde bezüglich des Einflusses auf das proliferative Verhalten der Tumorzellen und auf das immunmodulatorische Potential der bmMSCs untersucht. Daraus ergab sich, dass das durch adipoMSC konditionierte Medium zu einer reduzierten Proliferation der Tumorzellen führte und dass adipoMSCs ein geringeres immunmodulatorisches Potential aufwiesen. Das immunmodulatorische Potential korreliert mit dem Grad der adipogenen Differenzierung.

4. Diskussion

4.1. Einfluss der Hyaluronsäure auf die Tumorprogression kutaner Plattenepithelkarzinome

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, wie die HA das Wachstum kutaner PEKs beeinflusst. Dabei stand insbesondere das HA-degradierende Enzym HYAL1 und dessen Einwirken auf das Überleben des Tumors im Fokus.

4.1.1. Einfluss der Hyaluronsäure-Matrix auf die Progression von Plattenepithelkarzinomen *in vitro*

Die Aufgaben der HA in Bezug auf die Tumorprogression sind vielfältig und erscheinen widersprüchlich. Um die verschiedenen Funktionsweisen der HA zu verstehen, gilt es, zwischen langkettigen HA-Polymeren und verschieden großen HA-Fragmenten zu differenzieren. Dabei wird die HA-Matrix während des Wachstums umstrukturiert und sowohl HMW-HA als auch LMW-HA können tumorfördernde Eigenschaften aufweisen. Dementsprechend kann durch differenzielle Expression der HA-produzierenden Proteine HAS1-3 sowie HA-degradierenden Enzyme, vorwiegend HYAL1 und -2, die Progression eines Tumors beeinflusst werden.

Der prädominante Risikofaktor für die Ausprägung eines kutanen PEKs ist eine langfristige Exposition der Haut gegenüber Sonnenlicht, insbesondere aufgrund der darin enthaltenen UVB-Strahlung. Diese kann zu einer Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53* führen, die für die Genese eines PEKs essentiell ist [6]. UVB-Strahlung hat aber auch eine direkte Auswirkung auf die HA-Matrix der Haut. Chronische UVB-Bestrahlung der Haut führt zu einem reduzierten HA-Gehalt, der mit einer verminderten Expression der *HAS1-3* einhergeht [143, 144]. Die Expression der HA-degradierenden Enzyme *HYAL1* und *HYAL2*, sowie die des HA-Rezeptors *CD44* wird nicht beeinflusst. In PEK der Lunge und in hnSCC weisen undifferenzierte Karzinomstadien einen reduzierten HA-Gehalt auf. Dieser ist mit unterschiedlichen Prognosen assoziiert. Während in undifferenzierten hnSCC die Überlebensrate reduziert ist, weisen undifferenzierte PEK der Lunge eine erhöhte Überlebensrate auf [145, 146]. In kutanen PEKs ist der HA-Gehalt im Vergleich zur gesunden Haut erhöht und korreliert mit dem Grad der Differenzierung des Tumors [147]. Ursächlich dafür ist eine erhöhte Expression der *HAS3* in kutanen PEK (Benjamin Kellner, nicht veröffentlicht). Die HA-degradierenden Enzyme *HYAL1* und *HYAL2* sind ebenfalls hochreguliert. Dies hat eine Verschiebung des HA-Profiles zur Folge, sodass A431 Zellen mehr LMW-HA produzieren als NHEKs (Dr. Katharina Röck, nicht veröffentlicht). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression EZM-assoziiierter Proteine zwischen A431

Zellen und NHEKs verglichen. Durch diese Analyse konnte die in PEK beobachtete Hochregulierung der Gene *HAS3*, *HYAL1* und *HYAL2* *in vitro* bestätigt werden. Die Ausschaltung dieser Gene durch siRNA ergab, dass eine Herabregulierung von *HYAL1* zu einer reduzierten Zellzahl führte. Das reduzierte Wachstum nach *HYAL1 knockdown* (KD) ist durch einen Anstieg der Caspase 3- induzierten Apoptose begründet, wohingegen die Proliferationsrate nicht beeinflusst wird. Im Urothelkarzinom führt eine reduzierte Aktivität von *HYAL1* ebenfalls zu einem apoptotischen Phänotyp, begründet durch eine Überexpression der Spleißvariante *HYAL1v1*. Diese bildet mit *HYAL1* einen enzymatisch inaktiven Komplex und aktiviert somit die Caspasen 3, 8 und 9 [121]. Da die nicht transformierten Zelllinien NHDF und NHEK keinen apoptotischen Phänotyp nach Herabregulierung von *HYAL1* aufwiesen, könnte dieses Protein ein mögliches Ziel einer gerichteten Tumor-Therapie sein. Die Herabregulierung von *HAS3* und *HYAL2* hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter. Jedoch führte eine reduzierte Expression von *HAS3* zu einem signifikant reduzierten HA-Gehalt im Zellüberstand. Die Überlebensrate der Zellen blieb davon unbeeinflusst, sodass nicht der HA-Gehalt selbst, sondern vielmehr die Produktion von LMW-HA durch *HYAL1* für den anti-apoptotischen Effekt verantwortlich ist. Ein anti-apoptotischer Effekt niedermolekularer HA-Fragmente konnte bisher nur in der humanen myeloischen Leukämie-Zelllinie K-562 nachgewiesen werden [132]. Dabei führte die exogene Behandlung mit HA-Tetrasacchariden, wie sie durch die enzymatische Spaltung der HA durch *HYAL1* entstehen, zur Induktion des Hitzeschockproteins 72 (HSP72) [78].

Der KD von *HYAL1* hat zudem Auswirkungen auf die Größe der Lysosomen. Aufgrund des sauren pHs in den Lysosomen weist *HYAL1* hier eine hohe Aktivität auf [78]. Eine verringerte Expression von *HYAL1* kann dazu führen, dass durch *HYAL2* gespaltene und lysosomal internalisierte HA-Fragmente nicht weiter prozessiert werden und akkumulieren. Um dies abschließend zu verifizieren, müsste die HA-Konzentration in der lysosomalen Fraktion, beispielsweise mittels HA-ELISA, nachgewiesen werden.

Überexpression von *HYAL1* ist mit einer erhöhten Invasivität von Tumorzellen assoziiert und vermittelt in Mammakarzinomen eine erhöhte Motilität der Tumorzellen [119, 148]. Hier erfolgte die Analyse im 3D-Zellkulturmodell mit Hilfe eines sog. *Transwell-assays*. In dem hier verwendeten experimentellen Aufbau führte weder die Herabregulierung der Gene *HAS3*, *HYAL1* und *HYAL2*, noch die exogene Gabe von HMW-HA und LMW-HA zu einer veränderten akkumulierten Distanz innerhalb von 24 h. Dies deutet auf eine HA-unabhängige Regulation der Motilität in A431 Zellen hin.

Es scheint so, dass der tumorfördernde Einfluss der HYAL1 auf A431-Zellen darauf beruht, dass die durch Degradation entstehende LMW-HA die Überlebensrate der Krebszellen steigert und die Apoptose inhibiert. Die Überexpression von *HYAL1* könnte durch das im kutanen PEK mutierte *TP53* begründet sein. *In vitro* Studien mit verschiedenen Zelllinien des Prostatakarzinoms zeigten einen Zusammenhang zwischen der Mutation von *TP53* und der Überexpression des Transkriptionsfaktor Protein der frühen Wachstumsreaktion 1 (*EGR-1*) auf [149]. Die pharmakologische Inhibition oder eine reduzierte Expression von *TP53* mittels gerichteter siRNA reduzieren die Expression von *EGR-1*, während eine induzierte Überexpression von *TP53* die Expression von *EGR-1* nicht beeinflusst [149]. Lediglich ein mutiertes *TP53* steigert die Expression des Transkriptionsfaktor *EGR-1*, vermittelt über den ERK1/2 Signalweg [149]. Die Expression von *HYAL1* wiederum wird über die Methylierung des C⁻⁷¹ und C⁻⁵⁹ reguliert [150]. Chromatin-Immunpräzipitation (CHIP)-Analysen zeigten, dass in *HYAL1* exprimierenden Zellen *EGR-1* den Promotor bindet und die Deletion der Consensus-Sequenz CC⁻⁷¹GCCC zu einer 90 %igen Reduktion der *HYAL1*-Expression führt [150].

4.1.2. HYAL1 aktiviert eine anti-apoptotische Signalkaskade in Plattenepithelkarzinomen *in vitro*

Trotz der einfachen Struktur der HA, ist dieses Molekül in der Lage mit verschiedenen Matrix-Komponenten und auf der Zellmembran lokalisierten Rezeptoren, den sog. Hyaladhäringen, zu interagieren. Dabei variiert die Interaktion mit den Rezeptoren, genau wie die dadurch ausgelöste Zellantwort zwischen verschiedenen Zellarten. Ebenfalls ist die Größe der HA-Fragmente von besonderer Bedeutung. Aus vorherigen Arbeiten ist bekannt, dass die erhöhte Expression der *HAS3* in kutanen PEK zu einer verstärkten HA-Synthese führt. Die simultane Überexpression der Hyaluronidasen *HYAL1* und *HYAL2* führt zur Umsatzsteigerung der HA und zur Akkumulation von LMW-HA. Bei akuten Verletzungen der Lunge konnte gezeigt werden, dass die Heilung in Abhängigkeit der Bindung LMW-HA an die Rezeptoren TLR2 und -4 reguliert wird [141]. Die dadurch aktivierte Signalkaskade führt zur Aktivierung von NFκB in Abhängigkeit von Myd88. Die gezielte Inhibition des TLR4 mit Hilfe des Inhibitors CLI-095 führte in A431 Zellen zu einer dosisabhängigen Reduktion der Zellzahl als Resultat einer erhöhten apoptotischen und reduzierten proliferativen Rate. Sowohl Proliferation als auch das Überleben der Zellen kann durch TLR4 über die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NFκB moduliert werden [151]. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse stehen jedoch in Kontrast zu jüngsten Studien, in der die Aktivierung der Rezeptoren TLR2 und -4 durch LMW-HA in glomerulären Mesangiumzellen widerlegt wird [152]. In der Arbeit von Ebid und Kollegen wurden glomeruläre Mesangiumzellen mit HA-Polymeren mit einer Größe von < 3.000

Da stimuliert und die Aktivität der Rezeptoren TLR2 und -4 anhand des synthetisierten Interleukin-6 (IL-6) bewertet. Da die Bindung des Lipoproteins zu TLR2 und der Lipopolysaccharide (LPS) zu TLR4 auf den lipophilen Eigenschaften der Agonisten beruht, wird die direkte Bindung LMW-HA zu diesen Rezeptoren aufgrund der lipophoben Eigenschaften der HA ausgeschlossen [153, 154]. Jedoch kann über die Bindung von LMW-HA an CD44 die Aktivierung von TLR4 vermittelt werden, indem die Rezeptoren CD44 und TLR4 komplexieren [155]. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die tumorfördernden Eigenschaften der LMW-HA in A431 Zellen durch die Aktivierung des TLR4 vermittelt werden.

Durch die Verwendung eines kommerziell erhältlichen *Array Kits* wurde nach Herabregulierung von *HYAL1* die Regulation diverser in die Vermittlung der Apoptose involvierten Proteine untersucht. Die dabei beobachtete erhöhte Spaltung von PARP und der Caspase-3 bestätigten die Induktion der Apoptose nach *HYAL1 KD*. Des Weiteren führt der *HYAL1 KD* zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1 (p44 MAPK) und ERK2 (p42 MAPK). Dies ist relevant, da die Phosphorylierung am Thr202/Tyr204 zur Aktivierung von ERK1/2, welche Teil der Ras-Raf-ERK Signalkaskade sind [156]. ERK1/2 wurden in einer Vielzahl von Studien als pro-apoptotische Mediatoren beschrieben [157].

Im Gegensatz zu ERK1/2 ist die Phosphorylierung der Kinase TAK1 am Ser412 signifikant reduziert. Die Phosphorylierung am Ser412 ist neben den Phosphorylierungen am Thr184 und Thr187 essenziell für die Aktivierung von TAK1 [158]. Die Menge des gesamten Proteins TAK1 ist unverändert, sodass *HYAL1* Einfluss auf die Aktivierung, nicht aber auf die Synthese hat. Eine Reduktion der Aktivierung von TAK1 geht mit einer Erhöhung der apoptotischen Rate einher. Gegenläufig kann TAK1 durch den Wachstumsfaktor TGF- β 1 aktiviert werden [140]. Die verringerte Aktivierung von TAK1 nach *HYAL1 KD*, sowie die daraus resultierende erhöhte apoptotische Rate, konnte durch die exogene Stimulation mit TGF- β 1 rückgängig gemacht werden. Daraus kann geschlossen werden, dass aktiviertes TAK1 essenziell für das Überleben von A431 Zellen ist und einen anti-apoptotischen Effekt vermittelt. Dies wurde durch die Behandlung von A431 Zellen mit dem spezifischen TAK1-Inhibitor, (5Z)-7-Oxozeaenol, bestätigt. (5Z)-7-Oxozeaenol (CAS 66018-38-0) ist ein zellpermeabler, selektiver, irreversibler und ATP-kompetitiver Inhibitor von TAK1 [159]. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Ergebnissen führte die Behandlung der A431 Zellen mit (5Z)-7-Oxozeaenol erwartungsgemäß zu einem apoptotischen Phänotyp und einer dosisabhängigen Reduktion der Zellzahl. TAK1 ist ein zentraler Bestandteil der TLR- und Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R)-vermittelten Signalkaskade. In Folge der Aktivierung

dieser Signalwege wird TAK1 durch die TAK1-Bindeproteine 1 und 2 (TAB1 und -2) rekrutiert und durch den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) aktiviert. TAK1 selbst wiederum aktiviert den I κ B Kinase Komplex (IKK) über einen bisher noch unbekanntem Mechanismus. IKK wiederum phosphoryliert die inhibitorische Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF κ B, dem sog. I κ B. Dies führt zu der Degradation von I κ B durch das Proteasom [160, 161]. Dementsprechend ist die Menge des gesamten I κ B nach HYAL1 KD erhöht. Dies hat zur Folge, dass NF κ B durch I κ B gebunden und dessen Translokation in den Kern verhindert wird [162]. Im Kern fungiert NF κ B als Transkriptionsfaktor für inflammatorische, pro-proliferative und anti-apoptotische Gene [163]. Wichtige Gene, deren Expression durch NF κ B reguliert wird, sind die sog. Apoptose-Inhibitoren (IAPs), die aufgrund ihrer inhibitorischen Einfluss auf die Caspasen anti-apoptotisch wirken. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der Gene *CIAP2* und *XIAP* nach *HYAL1* KD signifikant reduziert war. Diese Ergebnisse deuten auf TAK1 als zentralen Regulator des Überlebens kutaner PEK hin. Dessen Aktivierung wird durch die Interaktion zwischen LMW-HA und TLR4 vermittelt. Diese Ergebnisse stimmen mit wissenschaftlichen Erkenntnissen der letzten Jahre überein, in denen für TAK1 ebenfalls eine bedeutende Rolle in Tumorprogression und -überleben beschrieben wurde. So führt die genetische Herabregulierung von TAK1 oder Applikation von LYTAK1, einem oral verfügbaren TAK1-Inhibitor, zu einer reduzierten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika im Pankreaskarzinom. Diese wird über eine reduzierte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B vermittelt und macht die Tumorzellen sensitiver gegenüber einer Behandlung mit Gemcitabin, SN38 oder Oxaliplatin *in vitro* [164]. Gleichermaßen konnte in Mamma- und Kolonkarzinomzellen, nicht aber in normalen Brustepithelzellen, eine erhöhte Effizienz des Topoisomerase-Inhibitors Camptothecin nach Inhibition von TAK1 nachgewiesen werden [165]. In KRAS-abhängigen Darmkrebszellen fördert die Inhibition von TAK1 mit (5Z)-7-Oxozeaenol die Apoptose und verhindert entsprechend eine Tumorprogression [166]. Es wurde bislang nicht gezeigt, ob die in dieser Arbeit verwendeten A431 Zellen ebenfalls KRAS-abhängig sind. Dennoch konnten in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition von TAK1 zum Zelltod der A431 Zellen *in vitro* führte. Auch *in vivo* waren die Ergebnisse reproduzierbar. In einem murinen Xenograftmodell der A431 Zellen konnte die Tumorprogression nach peritonealer Applikation von (5Z)-7-Oxozeaenol inhibiert werden. Sowohl in der zuvor genannten Studie, als auch in dieser Arbeit handelt es sich um ein Regressionsmodell, welches die Inhibition von TAK1 als vielversprechende Zielstruktur in der Therapie eines Malignoms darstellt[166].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch in kutanen PEK TAK1 das Überleben der Tumorzellen reguliert und durch dessen Inhibition zur Induktion von Apoptose führt. Neuartig ist dabei die Rolle der LMW-HA, die über die Bindung des TLR4 diesen Signalweg aktiviert und somit tumorfördernde Eigenschaften aufweist.

4.1.3. Auswirkungen der Interaktion des Hyaluronsäure-Systems mit TAK1 auf die Progression kutaner Plattenepithelkarzinome *in vivo*

Sowohl die Synthese der HA, als auch die Expression von *HYAL1* und *TAK1* wurden in klinischen Studien mit verschiedenen Prognosen diverser Tumorentitäten assoziiert. In nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) korreliert ein hoher zellassoziierter HA-Gehalt mit einem geringen Grad der Tumordifferenzierung, jedoch zu einem verlängerten krankheitsfreien Überleben führt. [167]. Im Gegensatz dazu ist dieses in der Subpopulation der Adenokarzinome aber verlängert. Eine solche Korrelation zwischen dem Grad der Differenzierung und der HA-Synthese bzw. Expression von *HYAL1* und *TAK1* konnte in den von der Dermatologie des Uniklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellten Hautproben nicht festgestellt werden. Auch konnte keine Abnahme des HA-Gehalts bei gleichzeitiger Zunahme der *HYAL1*-Konzentration beobachtet werden. Dies kann durch die Affinität des für die Färbung verwendeten HA-Bindeproteins auch zu sehr kleinen HA-Fragmenten erklärt werden, sodass auch die durch Spaltung der HA durch *HYAL1* entstandenen niedermolekularen HA-Polymere detektiert werden. Die immunhistochemischen Färbungen deuten jedoch an, dass die zuvor *in vitro* beschriebene Induktion von *TAK1* durch *HYAL1* tumorspezifisch ist. Nur in Tumorgewebe mit einem starken *HYAL1*-Signal konnte eine erhöhte Aktivierung von *TAK1* beobachtet werden. Im nicht-transformierten Gewebe, welches ebenfalls eine hohe Expression von *HYAL1* aufweist, wie beispielsweise in den Schweißdrüsen, ist die Aktivierung von *TAK1* nicht zu beobachten. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass in nicht-transformierten Zellen, wie NHEK und NHDF, das Überleben der Zellen unabhängig von *TAK1* reguliert wird und dadurch die Herabregulierung von *HYAL1 in vitro* keine Apoptose induziert.

4.1.4. Modulation der Hyaluronsäure-Matrix als therapeutischer Ansatz zur Reduktion der Progression kutaner Plattenepithelkarzinome

Die durch UVB-Strahlung induzierte Genese eines PEKs führt zu einer Hochregulierung der Gene *HAS3*, *HYAL1* und *HYAL2*. Dies hat zur Folge, dass vermehrt LMW-HA produziert wird. Die obigen Ausführungen zeigen, dass die durch *HYAL1* produzierte LMW-HA über die Interaktion mit TLR4 die Aktivierung von *TAK1* steigert und in Folge dessen die Expression anti-apoptotischer Gene gefördert wird. In Kapitel 111.3.1.2 wurde bereits der Effekt von 4-MU auf verschiedene Tumorentitäten geschildert. Mit Hilfe

des HAS-Inhibitors 4-MU und des Hyaluronidase-Inhibitors Vcpal konnte bewiesen werden, dass die pharmakologische Modulation des HA-Systems die Progression kutaner PEK reduziert. Beide Inhibitoren führten zu einer starken Reduktion der Zellzahl aufgrund einer erhöhten apoptotischen und einer reduzierten proliferativen Rate. Die durch die Behandlung mit 4-MU erhaltenen Ergebnisse verhalten sich gegensätzlich zu den mit siHAS3 transfizierten Zellen. Sowohl nach Behandlung mit 4-MU, als auch nach *HAS3* KD, ist der HA-Gehalt um ca. 50 % reduziert. Bei ausschließlicher Herabregulierung von *HAS3* ist jedoch kein Einfluss auf die apoptotische Rate zu erkennen, sodass der Effekt der Zellreduktion nicht allein auf einen reduzierten HA-Gehalt zurückzuführen ist. Um diese widersprüchlichen Ergebnisse näher zu erläutern muss untersucht werden, ob die Aktivierung von TAK1 nach *HAS3* KD beeinflusst ist.

4-MU und Vcpal reduzierten die Aktivierung von TAK1 über verminderte Phosphorylierung am Ser412. Der hemmende Effekt der Inhibitoren konnte in einem murinen A431 Regressionsmodell reproduziert und somit *in vivo* belegt werden. Sowohl die perorale Gabe von 4-MU, als auch die intravenöse Injektion von Vcpal haben einen signifikanten Einfluss auf die Tumorprogression. Beide Substanzen sind dank ihrer guten Verträglichkeit vielversprechende, zukünftige Therapeutika, die zur Reduktion der Progression kutaner PEK eingesetzt werden könnten. In einem murinen UVB-induzierten PEK-Modell führt 4-MU zu einer Reduktion der stromalen HA und der Aktivität von TAK1. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird folgende Hypothese postuliert (Abbildung 36):

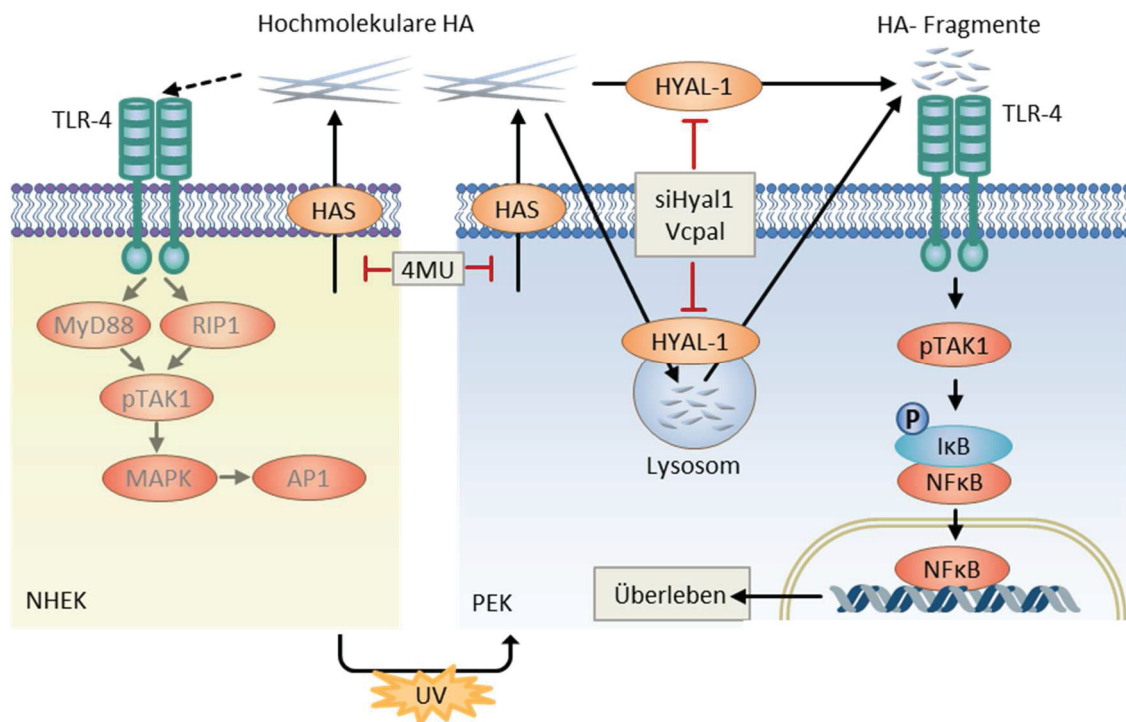


Abbildung 36: In kutanen PEK interagiert LMW-HA mit TLR und fördert TAK1-vermittelt das Zellüberleben.

In NHEK kommt es nur zu einer geringen Aktivierung des TLR4 und der nachgeschalteten Signalkaskade. Durch UV-Bestrahlung kommt es zur Ausprägung eines PEK. Diese zeichnen sich durch eine Überexpression des Gens *HYAL1* aus, welches die synthetisierte HA in niedermolekulare HA-Fragmente degradiert. Diese sind in der Lage den TLR4 zu aktivieren, was wiederum zur Aktivierung von TAK1 führt. Die TAK1-vermittelte Phosphorylierung von IκB fördert die Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB in den Kern und somit die Expression anti-apoptotischer Gene. **TLR4**: Toll-ähnlicher Rezeptor 4, **MyD88**: Myeloide Differenzierungs-Primärantwort, **RIP1**: Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Proteinkinase 1, **pTAK1**: phosphorylierter Transformierender Wachstumsfaktor β-aktivierte Kinase 1, **MAPK**: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, **AP1**: Aktivatorprotein 1, **HYAL1**: Hyaluronidase 1, **IκB**: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, **NFκB**: Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (erstellt in Zusammenarbeit mit Dr. Dr. Sören Twarock)

Chronische UVB-Bestrahlung kann zur Ausbildung eines PEK führen. Durch die Überexpression der Gene *HAS3*, *HYAL1* und *HYAL2* verschiebt sich das HA-Profil dabei zu Gunsten der LMW-HA. Diese wiederum aktiviert über die Interaktion mit TLR4 die Kinase TAK1, welche dann die Phosphorylierung von IκB reguliert und diese somit für die Degradation bestimmt. Dadurch ist der Transkriptionsfaktor NFκB in der Lage in den Zellkern zu translozieren und dort die Expression anti-apoptotischer Gene zu begünstigen. Wird die Synthese der HA oder ihre Degradation durch HYAL1 inhibiert, kommt es zur Induktion der Apoptose und einer Akkumulation der HA in den Lysosomen. Somit wurde in dieser Arbeit ein neuer Mechanismus präsentiert, bei dem durch HYAL1 produzierte LMW-HA Überleben und Progression kutaner PEK über eine Aktivierung der TLR4-TAK1-Signalkaskade regulieren. Zusätzlich stellt die pharmakologische Modulation der HA-Matrix eine therapeutische Strategie dar, um das Wachstum kutaner PEK zu inhibieren.

4.2. Einfluss der Hyaluronsäure auf die Interaktion zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, wie die Interaktion zwischen MSCs und Tumorzellen durch die HA beeinflusst wird. Dabei lag der Fokus auf der Fragestellung, auf welche Weise Tumorzellen die MSCs modulieren und inwieweit dies die Tumorprogression in Hinblick auf die Etablierung einer pre-metastatischen Nische beeinflusst.

4.2.1. Hyaluronsäure beeinflusst die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Adipozyten

Eine bedeutende Eigenschaft von MSCs ist ihre Pluripotenz und die daraus resultierende Fähigkeit, sich in verschiedenste Zellen mesodermalen Ursprungs zu entwickeln. Als Maßstab dafür wurde das Potential der MSCs, sich in Osteoblasten und Adipozyten zu differenzieren, analysiert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU das Potential der Stammzellen, sich in Adipozyten zu differenzieren, gesteigert werden konnte. Die Differenzierung zu Osteoblasten blieb unbeeinflusst. Das Einwirken der HA auf das Differenzierungspotential und die Pluripotenz der MSCs ist weitestgehend ungeklärt. Studien mit aus der Plazenta isolierten MSCs (PDMSC) haben gezeigt, dass HA diese Zellen in einem Ruhestadium hält und das Differenzierungspotential über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten kann [168]. Die exogene Zufuhr von HA in einem 3D-Hydrogel-Zellkulturmodell steigert die chondrogene Differenzierung der MSCs [169]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass HA Einfluss darauf hat, in welchen Zelltyp MSCs differenzieren. Um diese Theorie zu bestätigen, muss der Einfluss exogen zugeführter HA auch auf die adipogene und osteogene Differenzierung untersucht werden.

4.2.2. Mammakarzinomzellen modulieren die Hyaluronsäure-Matrix und das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen

MSCs sind essenzieller Bestandteil des Tumorstromas und tragen zur Progression und Metastasierung von Tumorzellen bei. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss Tumorzellen auf die HA-Synthese der MSCs haben. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 im Gegensatz zu der GBM-Zelllinie U87-MG die HA-Synthese der MSCs steigerten. Dies war sowohl bei einem direkten Zell-Zell-Kontakt zu beobachten, als auch bei Überstandexperimenten. Daraus lässt sich ableiten, dass von Mammakarzinomzelllinien sezernierte Faktoren die HA-Synthese induzieren. Es ist anzunehmen, dass die

gesteigerte HA-Synthese über HAS2 vermittelt wird, da diese in MSCs die am stärksten exprimierte HAS-Isoform darstellt (Jessica Wladarz, nicht veröffentlicht). In intestinalen mesenchymalen Zellen konnte gezeigt werden, dass durch die exogene Gabe von Interleukin-1 β die Expression von *HAS2* gesteigert werden kann [170]. Im Model des ösophagealen PEK hingegen wird bei direktem Zell-Zell-Kontakt die Menge an *HAS2*-mRNA in Fibroblasten erhöht [102]. Dieser Anstieg wird durch den Wnt-Signalweg vermittelt. In Melanomen wird der Großteil der HA durch umliegende stromale Fibroblasten produziert. Als Erklärung wird postuliert, dass die HA-Produktion bedingt durch das im Zuge des Warburg-Effekts synthetisierte Laktat gesteigert wird [171]. Der genaue Mechanismus der Stimulation der HA-Synthese in MSCs durch die Mammakarzinomzelllinien muss noch aufgeklärt werden.

Des Weiteren wurde untersucht, ob Tumorzellen das Differenzierungspotential der bmMSCs beeinflussen. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse ergaben, dass die osteogene Differenzierung unbeeinflusst blieb. Es wurde jedoch festgestellt, dass die invasive Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 das adipogene Differenzierungspotential durch Modulation der HA-Matrix senkt, während eine reduzierte HA-Synthese durch 4-MU nachweislich die Ausdifferenzierung zu Adipozyten fördert. Aufgrund der Beobachtung, dass die Konditionierung der bmMSCs durch die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 zu einer Steigerung der HA-Synthese, kann angenommen werden, dass das adipogene Differenzierungspotential unter anderem durch die Modulation der HA-Matrix reguliert wird. Diese Hypothese wird durch die Tatsache untermauert, dass das reduzierte Differenzierungspotential durch die Gabe von 4-MU aufgehoben wurde. Jedoch müssen auch weitere Faktoren einen Einfluss auf das adipogene Differenzierungspotential haben, da eine reduzierte Differenzierung durch die epitheliale Mammakarzinomzelllinie MCF-7, die ebenfalls die HA-Synthese der MSCs steigerte, nicht beobachtet werden. Aufschluss darüber könnte eine Analyse des Sekretoms beider Zelllinien hinsichtlich Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ (PPAR γ)-aktivierender Zytokine geben. Derzeit wird angenommen, dass eine Liganden-abhängige Aktivierung von PPAR γ erfolgen muss, damit eine adipogene Differenzierung induziert werden kann [172]. Des Weiteren werden die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse durch Studien mit der Zelllinie des Prostatakarzinoms Du145 unterstützt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Prostatakarzinomzellen über die Sekretion von Exosomen Einfluss auf die Differenzierung kommerziell erworbener MSC nehmen und die adipogene Differenzierung hemmen [173]. Zusätzlich wird die Differenzierung in α glattmuskulärem Aktin (α SMA) positive Myofibroblasten begünstigt, die wiederum aufgrund der hohen Sekretion von VEGF und Matrix-regulierenden Faktoren pro-

angiogenetische Eigenschaften besitzen und die Tumorproliferation und -Invasivität im 3D-Modell fördern [173].

Der Einfluss von Tumorzellen auf die osteogene Differenzierung ist weitestgehend unbekannt. Es kann angenommen werden, dass Tumorzellen einen positiven Einfluss auf die osteogene Differenzierung haben könnten. Grund für diese Annahme liefern abermals Untersuchungen des Prostatakarzinoms, bei dem Knochenmetastasen einen Osteoblasten-Phänotyp aufweisen [174].

4.2.3. Mesenchymale Stammzellen reduzieren die Motilität invasiver Mammakarzinomzellen

Zellmigration und Invasion sind entscheidende Parameter der metastatischen Dissemination von Tumorzellen und der Formierung von Metastasen. Dies geschieht in Folge einer phänotypischen Veränderung, die unter dem Begriff EMT bekannt ist. Dabei kommt es zu einer Verschiebung der Cadherine mit Abnahme der Funktion des epithelialen E-Cadherins und Zunahme der Expression des mesenchymalen N-Cadherins [175]. In Mammakarzinomen führt die Zunahme von N-Cadherin zu einer Steigerung der Motilität der Tumorzellen [176]. MSCs induzieren EMT über die Expression von TGF- β , wobei ein direkter Zell-Zell-Kontakt benötigt wird [177]. Diesen Ergebnissen widersprach die Beobachtung, dass in direkter Kokultur von MSCs mit der invasiven Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 die Motilität über einen Zeitraum von 24 h reduziert wurde. Es scheint, dass die Wirkung der MSCs auf Tumorzellen, die bereits einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen, verändert ist. MSCs modulieren die Mikroumgebung der pre-metastatischen Nische. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass Tumorzellen über Sekretion bisher unbekannter Faktoren die HA-Synthese der MSCs in der pre-metastatischen Nische induzieren. Die HA kann bei der Rekrutierung der Tumorzellen mit dem Rezeptor CD44 auf der Oberfläche mesenchymaler Tumorzellen interagieren, die dadurch lokal gebunden werden. Ein solcher Mechanismus wurde bereits für neutrophile Granulozyten, eine Subpopulation der Leukozyten, beschrieben. Diese binden über CD44 an die HA des Blutgefäßendothels, wodurch die Leukozytenadhäsion und spätere -extravasation gefördert wird [178]. Jedoch ist dabei das migratorische Potential nicht beeinflusst. Ob MSCs gegebenenfalls mesenchymale-epitheliale Transition (MET) induzieren und daraus eine reduzierte Motilität resultiert, muss noch untersucht werden.

4.2.4. Adipogen differenzierte Stammzellen verlieren ihre tumorfördernden Eigenschaften

Die tumorfördernden Effekte der MSCs wurden hinlänglich beschrieben (Kapitel 1.2.2). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Tumorzellen vermehrt mit naiven MSCs interagieren und nicht mit adipogen differenzierten MSCs. Ob diese Interaktion HA-abhängig ist und ob die adipogene Differenzierung zu einer reduzierten HA-Synthese führt, muss noch untersucht werden.

MSCs steigern zudem die Proliferation der Tumorzellen. Aus der Nabelschnur isolierte MSCs aktivieren die ERK-Signalkaskade und fördern so die Proliferation der Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 *in vitro* [179]. Bei Kolonkarzinomen führen MSCs im Tumorstroma zu einem verstärkten Wachstum im Zuge einer erhöhten Proliferation *in vivo* [180]. Diese Proliferations-fördernden Eigenschaften konnten in der vorliegenden Arbeit durch MSC-konditioniertes Medium nicht reproduziert werden. Das lässt darauf schließen, dass ein direkter Zell-Zell-Kontakt zur Ausprägung proliferationsfördernder Merkmale benötigt wird. Jedoch konnte gezeigt werden, dass der Überstand von adipoMSCs die Proliferation der Mammakarzinomzelllinien reduziert. Daher kann vermutet werden, dass die Inhibition der adipogenen Differenzierung durch invasive Mammakarzinomzellen zu einem proliferativen Vorteil führt und das Wachstum in der metastatischen Nische begünstigt wird.

Eine weitere Eigenschaft der tumorfördernden MSCs ist das immunsuppressive Potential, welches insbesondere darauf beruht, dass die Proliferation zytotoxischer T-Zellen inhibiert wird. Isolierte humane bmMSCs erhalten ihr immunsuppressives Potential aufrecht und sind auch in Folge einer osteogenen oder chondrogenen Differenzierung in der Lage die Proliferation von T-Zellen zu inhibieren [181, 182]. Vergleichbare Studien mit humanen adipoMSCs sind bisher nicht publiziert. Jedoch führt eine adipogene Differenzierung muriner MSCs zu einer erhöhten Proliferation von T-Lymphozyten verglichen mit nativen MSCs [183]. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit mit den verwendeten humanen bmMSCs reproduziert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte adipogene Differenzierung durch die zusätzliche Gabe von 4-MU zu einem stärkeren Verlust des immunsuppressiven Potentials führt. 4-MU alleine hat keinen Einfluss auf das immunmodulatorische Potential der bmMSCs. Dies deutet darauf hin, dass die HA-Synthese nur das Differenzierungspotential, nicht aber das immunsuppressive Verhalten der bmMSCs beeinflusst.

Ein weiterer Aspekt dieses Experiments ist, dass es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten bmMSCs um kryokonservierte Zellen handelt. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten T-Zell-Proliferations-Versuchen hat der Prozess der Kryokonservierung keinen Einfluss auf das immunmodulatorische Potential. Dies ist insbesondere im Hinblick auf den Einsatz von bmMSCs in der zellbasierten Immuntherapie von Bedeutung. MSCs finden in der Klinik seit über 10 Jahren Verwendung und die Anzahl der klinischen Studien ist steigend. Dennoch konnten bis heute noch keine klinischen Standards etabliert werden. Die Möglichkeit MSCs zu isolieren und ohne Verlust des immunmodulatorischen Potentials zu kryokonservieren, könnte die klinischen Abläufe vereinfachen. Um abschließend festzustellen, ob das immunmodulatorische Potential kryokonservierter bmMSCs gegebenenfalls reduziert ist, müsste dieses Experiment vergleichend mit frisch isolierten MSCs durchgeführt werden.

4.2.5. Invasive Mammakarzinomzellen erhalten das immunsuppressive Potential mesenchymaler Stammzellen

Von MSCs stammende Exosomen sind in der Lage, die Funktion von Tumorzellen zu modulieren, indem diese z. B. die Expression der Matrix-Metalloprotease 2 (MMP-2) induzieren [184]. Andersherum sind auch Tumorzellen in der Lage, das Verhalten von bmMSCs zu modulieren. Von Prostatakarzinomzellen stammende Exosomen stimulieren die Differenzierung von bmMSCs zu einem pro-angiogenetischen myofibroblastischen Phänotyp mit tumorfördernden Eigenschaften [173]. Die Konditionierung mit Tumorüberstand von Mammakarzinom- und GBM-Zelllinien beeinflusst das immunmodulatorische Potential der bmMSCs in Bezug auf T-Zell Proliferation nicht. So scheint es, dass die immunsuppressive Eigenschaft der MSCs nicht durch sezernierte Faktoren der Tumorzellen beeinflusst wird. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die hier verwendeten Tumorzelllinien die adipogene Differenzierung der MSCs unterschiedlich stark beeinflussen. Dies spiegelte sich in einer differenziell ausgeprägten Reduktion der immunsuppressiven Eigenschaften der bmMSCs wieder. Der Überstand der invasiven Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 reduzierte die Differenzierung der bmMSCs in Adipozyten, während das Differenzierungspotential durch die epitheliale Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und der GBM-Zelllinie U87-MG nicht beeinflusst wurde. Dies führte dazu, dass in MDA-MB-231-Überstand stimulierte bmMSCs ihr immunmodulatorisches Potential beibehielten und die T-Zell Proliferation inhibierten. Dies wurde durch die Beobachtung bekräftigt, dass eine Förderung der adipogenen Differenzierung durch die zusätzliche Gabe von 4-MU das immunsuppressive Potential der bmMSCs wiederum senkte. Daraus lässt sich ableiten,

dass invasive Mammakarzinomzellen die adipogene Differenzierung inhibieren und dadurch das immunmodulatorische Potential aufrechterhalten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein potentieller Mechanismus gezeigt, der das unterschiedliche Metastasierungspotential diverser Tumorentitäten näher beschreibt. Während in 20-40 % der Patienten mit einem Mammakarzinom eine Fernmetastase auftritt, ist der prozentuale Anteil bei Patienten mit einem GBM mit 0,4 % nur sehr gering [22, 185]. Als mögliche Ursachen für dieses geringe Metastasierungspotential der GBMs werden in der Literatur die Blut-Hirn-Schranke, die sehr kurze Überlebenszeit und das Immunsystem angeführt [24, 25, 186]. Die Hypothese, dass GBM-Zellen die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können, ist widerlegt, da die Zahl der Patienten mit disseminierten Tumorzellen im peripheren Brutkreislauf (20,6 %) die Zahl der Patienten mit extrakraniellen Metastasen (0,4 %) übersteigt [22, 187]. Demnach sind metastasierende GBM-Zellen in der Lage, in den peripheren Blutkreislauf einzudringen. In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit, ist die verwendete GBM-Zelllinie U87-MG jedoch nicht in der Lage die pre-metastatische Nische so zu beeinflussen, dass ein Wachstum-begünstigendes Milieu geschaffen wird. Die bisher veröffentlichten Berichte von Fällen extrakranieller Metastasen im Rahmen eines GBM lassen vermuten, dass diese durch einen immunsuppressiven Zustand begünstigt wurden, welcher aus einer wiederholten Bestrahlungs- bzw. Chemotherapie resultierte [188, 189]. In Anbetracht der in dieser Dissertation erarbeiteten Resultate wird folgender Mechanismus postuliert (Abbildung 37):

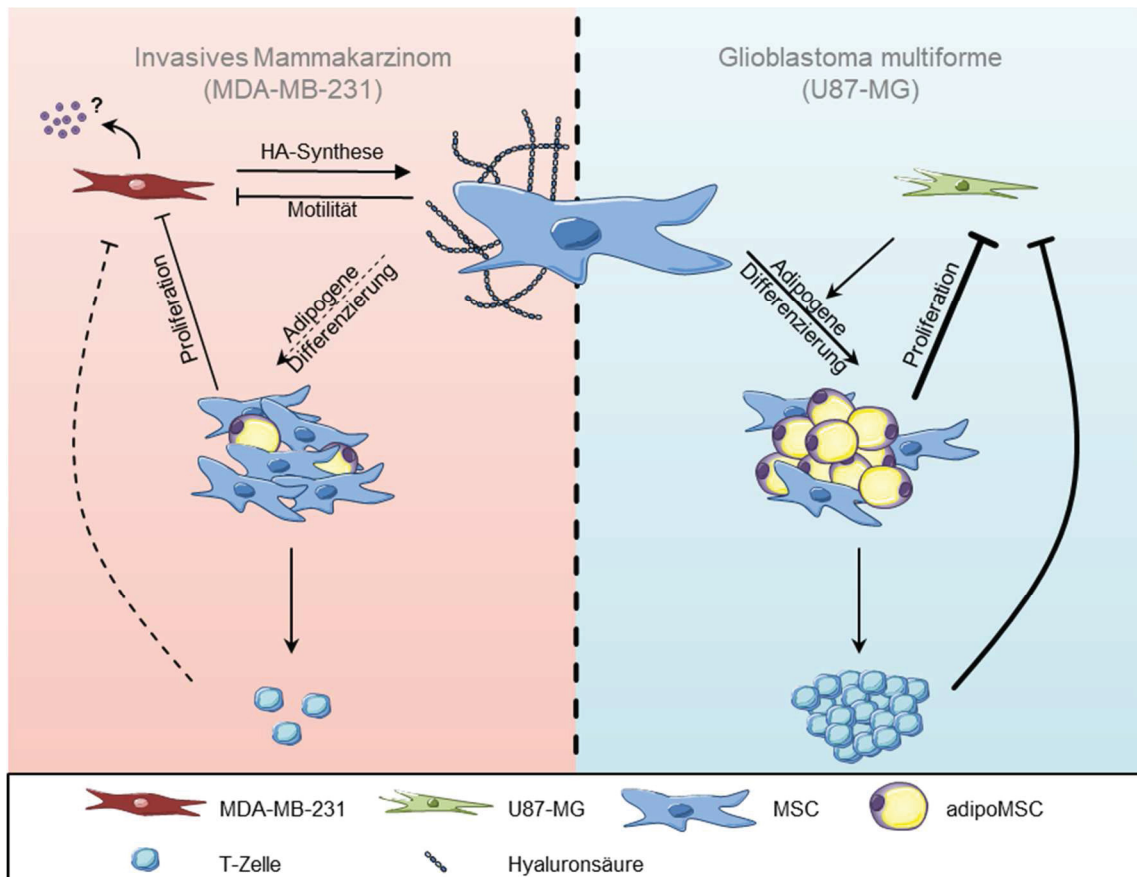


Abbildung 37: Einfluss der Zelllinien MDA-MB-231 und U87-MG auf mesenchymale Stammzellen.

Gezeigt werden potentielle Mechanismen, wie die invasive Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 (links) bzw. die GBM-Zelllinie U87-MG mit bmMSCs interagieren und so Einfluss auf die Modulation einer pre-metastatischen Nische nehmen.

Invasive Mammakarzinomzellen sind in der Lage die HA-Synthese der bmMSCs anzuregen. Die Induktion der HA-Synthese, aber auch die Sezernierung nicht unbekannter Faktoren führt zu einem reduzierten adipogenen Differenzierungspotential. Durch die Unterdrückung der adipogenen Differenzierung bleibt das immunmodulatorische Potential der bmMSCs erhalten und diese sind somit in der Lage die Proliferation zytotoxischer T-Zellen zu inhibieren. Des Weiteren wird durch die Inhibition der adipogenen Differenzierung die pro-proliferativen Eigenschaften der bmMSCs aufrechterhalten. Zusätzlich wurde gezeigt, dass durch native bmMSCs die Motilität der invasiven Mammakarzinomzellen reduziert wird, was auf die Induktion einer MET hindeutet. Somit interferieren invasive Mammakarzinomzellen mit der adipogenen Differenzierung, um eine pro-metastatische Mikroumgebung zu etablieren. Im Gegensatz zu der invasiven Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wird das adipogene Differenzierungspotential nicht durch die GBM-Zelllinie U87-MG beeinflusst. Dadurch

verlieren die bmMSCs ihr immunsuppressives Potential und reduzieren die Proliferation der in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien.

4.3. Einfluss der Hyaluronsäure auf die Tumorprogression und Metastasierung (Zusammenfassung)

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, wie die HA Einfluss auf verschiedene Prozesse eines Tumors nimmt. Im pathologischen Model des kutanen PEK wurde erörtert, wie die Degradation der HA durch HYAL1 das Überleben der Tumorzellen positiv reguliert. Dabei kommt es zur Aktivierung der anti-apoptotischen Signalkaskade TLR4-TAK1 und es konnte demonstriert, dass die pharmakologische Modulation der HA-Matrix durch 4-MU und Vcpal ein potentielles therapeutisches Ziel darstellt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Mechanismus untersucht, der das unterschiedliche Metastasierungspotential zwischen Mammakarzinome und GBM erklärt. Dieser basiert auf der Inhibition der adipogenen Differenzierung durch invasive Mammakarzinomzellen. Dadurch kreieren diese Zellen ihre eigene pre-metastatische Nische durch die Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Potentials und pro-proliferativen Eigenschaften der bmMSCs.

5. Literaturverzeichnis

1. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(6):449-58. doi: 10.1038/nrc1886. PubMed PMID: 16723991.
2. Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*. 1980;283(5743):139-46. PubMed PMID: 6985715.
3. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1889;8(2):98-101. PubMed PMID: 2673568.
4. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*. 2002;12(4):390-9; quiz 400-1. PubMed PMID: 12095893.
5. Neill US. Skin care in the aging female: myths and truths. *J Clin Invest*. 2012;122(2):473-7. doi: 10.1172/JCI61978. PubMed PMID: 22293186; PubMed Central PMCID: PMC3266803.
6. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(22):10124-8. PubMed PMID: 1946433; PubMed Central PMCID: PMC52880.
7. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL, Jr. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol*. 1992;26(6):976-90. PubMed PMID: 1607418.
8. Breuninger H, Gutknecht M, Dietz K, Rassner G. [Locally infiltrative growth of squamous cell carcinoma of the skin and treatment guidelines resulting from it]. *Hautarzt*. 1991;42(9):559-63. PubMed PMID: 1938407.
9. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2001;344(13):975-83. doi: 10.1056/NEJM200103293441306. PubMed PMID: 11274625.
10. Brash DE. Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas. *Br J Dermatol*. 2006;154 Suppl 1:8-10. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07230.x. PubMed PMID: 16712710.
11. Ferrandiz C, Malveyh J, Guillen C, Ferrandiz-Pulido C, Fernandez-Figueras M. Precancerous Skin Lesions. *Actas Dermosifiliogr*. 2017;108(1):31-41. doi: 10.1016/j.ad.2016.07.016. PubMed PMID: 27658688.
12. Uribe P, Gonzalez S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathol Res Pract*. 2011;207(6):337-42. doi: 10.1016/j.prp.2011.03.002. PubMed PMID: 21531084.
13. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(11):761-74. doi: 10.1038/nrc3106. PubMed PMID: 21993244; PubMed Central PMCID: PMC3632399.

14. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(4):1033-67. doi: 10.1677/ERC-06-0001. PubMed PMID: 17158753.
15. Lacey JV, Jr., Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang SC, Leitzmann MF, et al. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer*. 2009;9:84. doi: 10.1186/1471-2407-9-84. PubMed PMID: 19292893; PubMed Central PMCID: PMCPMC2670317.
16. Crispo A, Grimaldi M, D'Aiuto M, Rinaldo M, Capasso I, Amore A, et al. BMI and breast cancer prognosis benefit: mammography screening reveals differences between normal weight and overweight women. *Breast*. 2015;24(1):86-9. doi: 10.1016/j.breast.2014.11.005. PubMed PMID: 25466863.
17. Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, et al. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell*. 1998;2(3):317-28. PubMed PMID: 9774970.
18. Connor F, Bertwistle D, Mee PJ, Ross GM, Swift S, Grigorieva E, et al. Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation. *Nat Genet*. 1997;17(4):423-30. doi: 10.1038/ng1297-423. PubMed PMID: 9398843.
19. Barnard ME, Boeke CE, Tamimi RM. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1856(1):73-85. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.06.002. PubMed PMID: 26071880.
20. Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist*. 2011;16 Suppl 1:1-11. doi: 10.1634/theoncologist.2011-S1-01. PubMed PMID: 21278435.
21. Holland EC. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(12):6242-4. PubMed PMID: 10841526; PubMed Central PMCID: PMCPMC33993.
22. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(6):479-89. PubMed PMID: 15977639.
23. Robert M, Wastie M. Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases. *Biomed Imaging Interv J*. 2008;4(1):e3. doi: 10.2349/bij.4.1.e3. PubMed PMID: 21614314; PubMed Central PMCID: PMCPMC3097703.
24. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330. PubMed PMID: 15758009.
25. Fonkem E, Lun M, Wong ET. Rare phenomenon of extracranial metastasis of glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2011;29(34):4594-5. doi: 10.1200/JCO.2011.39.0187. PubMed PMID: 22042941.

26. Jellinger K, Minauf M, Salzer-Kuntschik M. Oligodendroglioma with extraneural metastases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1969;32(3):249-53. PubMed PMID: 5795118; PubMed Central PMCID: PMC496498.
27. Pasquier B, Pasquier D, Lachard A, N'Golet A, Panh MH, Couderc P. [Extraneural metastasis of central nervous system tumours (author's transl)]. *Bull Cancer*. 1979;66(1):25-8. PubMed PMID: 420943.
28. Hamilton JD, Rapp M, Schneiderhan T, Sabel M, Hayman A, Scherer A, et al. Glioblastoma multiforme metastasis outside the CNS: three case reports and possible mechanisms of escape. *J Clin Oncol*. 2014;32(22):e80-4. doi: 10.1200/JCO.2013.48.7546. PubMed PMID: 24567434.
29. Fang H, Declerck YA. Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. *Cancer Res*. 2013;73(16):4965-77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0661. PubMed PMID: 23913938; PubMed Central PMCID: PMC3815577.
30. Sceneay J, Chow MT, Chen A, Halse HM, Wong CS, Andrews DM, et al. Primary tumor hypoxia recruits CD11b+/Ly6Cmed/Ly6G+ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res*. 2012;72(16):3906-11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3873. PubMed PMID: 22751463.
31. Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res*. 2012;72(9):2162-71. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3687. PubMed PMID: 22549946; PubMed Central PMCID: PMC3342842.
32. Mahic M, Yaqub S, Johansson CC, Tasken K, Aandahl EM. FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *J Immunol*. 2006;177(1):246-54. PubMed PMID: 16785520.
33. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PubMed PMID: 21376230.
34. Wendt MK, Smith JA, Schiemann WP. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression. *Oncogene*. 2010;29(49):6485-98. doi: 10.1038/onc.2010.377. PubMed PMID: 20802523; PubMed Central PMCID: PMC3076082.
35. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):362-74. doi: 10.1038/nrc1075. PubMed PMID: 12724734.
36. Wong AD, Searson PC. Live-cell imaging of invasion and intravasation in an artificial microvessel platform. *Cancer Res*. 2014;74(17):4937-45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1042. PubMed PMID: 24970480; PubMed Central PMCID: PMC4155070.
37. Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, Nadkarni KV, MacDonald IC, Groom AC. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am*. 2001;10(2):243-55, vii. PubMed PMID: 11382585.

38. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(11):834-46. doi: 10.1038/nrc2256. PubMed PMID: 17957189; PubMed Central PMCID: PMCPMC2519109.
39. Kitzis A, Brizard F, Dascalescu C, Chomel JC, Guilhot F, Brizard A. Persistence of transcriptionally silent BCR-ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia patients in sustained complete cytogenetic remission. *Leuk Lymphoma*. 2001;42(5):933-44. doi: 10.3109/10428190109097712. PubMed PMID: 11697648.
40. Karrison TG, Ferguson DJ, Meier P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(1):80-5. PubMed PMID: 9890174.
41. Indraccolo S, Stievano L, Minuzzo S, Tosello V, Esposito G, Piovan E, et al. Interruption of tumor dormancy by a transient angiogenic burst within the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(11):4216-21. doi: 10.1073/pnas.0506200103. PubMed PMID: 16537511; PubMed Central PMCID: PMCPMC1449673.
42. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820-7. doi: 10.1038/nature04186. PubMed PMID: 16341007; PubMed Central PMCID: PMCPMC2945882.
43. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7. PubMed PMID: 10102814.
44. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301-13. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003. PubMed PMID: 18786417.
45. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*. 2015;35(2). doi: 10.1042/BSR20150025. PubMed PMID: 25797907; PubMed Central PMCID: PMCPMC4413017.
46. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-40. PubMed PMID: 4150881.
47. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905. PubMed PMID: 16923606.
48. Karussis D, Kassis I, Kurkalli BG, Slavin S. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*. 2008;265(1-2):131-5. doi: 10.1016/j.jns.2007.05.005. PubMed PMID: 17610906.
49. Payne N, Siatskas C, Bernard CC. The promise of stem cell and regenerative therapies for multiple sclerosis. *J Autoimmun*. 2008;31(3):288-94. doi: 10.1016/j.jaut.2008.04.002. PubMed PMID: 18504116.

50. Yang J, Yan Y, Ciric B, Yu S, Guan Y, Xu H, et al. Evaluation of bone marrow- and brain-derived neural stem cells in therapy of central nervous system autoimmunity. *Am J Pathol.* 2010;177(4):1989-2001. doi: 10.2353/ajpath.2010.091203. PubMed PMID: 20724590; PubMed Central PMCID: PMCPMC2947293.
51. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71-4. PubMed PMID: 9082988.
52. Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J, et al. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature.* 2009;457(7225):92-6. doi: 10.1038/nature07434. PubMed PMID: 19052546; PubMed Central PMCID: PMCPMC2820276.
53. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature.* 2009;460(7252):259-63. doi: 10.1038/nature08099. PubMed PMID: 19516257; PubMed Central PMCID: PMCPMC2831539.
54. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371(9624):1579-86. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X. PubMed PMID: 18468541.
55. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99(10):3838-43. PubMed PMID: 11986244.
56. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One.* 2010;5(12):e14247. doi: 10.1371/journal.pone.0014247. PubMed PMID: 21151872; PubMed Central PMCID: PMCPMC2998425.
57. Nemeth K, Keane-Myers A, Brown JM, Metcalfe DD, Gorham JD, Bundoc VG, et al. Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(12):5652-7. doi: 10.1073/pnas.0910720107. PubMed PMID: 20231466; PubMed Central PMCID: PMCPMC2851758.
58. Mougiakakos D, Jitschin R, Johansson CC, Okita R, Kiessling R, Le Blanc K. The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood.* 2011;117(18):4826-35. doi: 10.1182/blood-2010-12-324038. PubMed PMID: 21389316.
59. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev.* 2004;13(3):263-71. doi: 10.1089/154732804323099190. PubMed PMID: 15186722.
60. Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, Vrohling M, Nussbaum K, Vom Berg J, et al. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ.* 2015;22(2):237-46. doi: 10.1038/cdd.2014.134. PubMed PMID: 25190142; PubMed Central PMCID: PMCPMC4291488.

61. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, et al. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant.* 2004;4(10):1614-27. doi: 10.1111/j.1600-6143.2004.00566.x. PubMed PMID: 15367216.
62. Huang W, La Russa V, Alzoubi A, Schwarzenberger P. Interleukin-17A: a T-cell-derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24(6):1512-8. doi: 10.1634/stemcells.2005-0156. PubMed PMID: 16513762.
63. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):383-96. doi: 10.1038/nri3209. PubMed PMID: 22531326.
64. Ren G, Zhao X, Wang Y, Zhang X, Chen X, Xu C, et al. CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNFalpha. *Cell Stem Cell.* 2012;11(6):812-24. doi: 10.1016/j.stem.2012.08.013. PubMed PMID: 23168163; PubMed Central PMCID: PMC3518598.
65. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* 2012;33(3):136-43. doi: 10.1016/j.it.2011.11.004. PubMed PMID: 22227317; PubMed Central PMCID: PMC3412175.
66. Yu PF, Huang Y, Han YY, Lin LY, Sun WH, Rabson AB, et al. TNFalpha-activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2+ neutrophils. *Oncogene.* 2017;36(4):482-90. doi: 10.1038/onc.2016.217. PubMed PMID: 27375023; PubMed Central PMCID: PMC5290040.
67. Abumaree MH, Al Jumah MA, Kalionis B, Jawdat D, Al Khaldi A, Abomaray FM, et al. Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev.* 2013;9(5):620-41. doi: 10.1007/s12015-013-9455-2. PubMed PMID: 23812784.
68. Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol.* 2006;80(3):267-74. doi: 10.1016/j.yexmp.2005.07.004. PubMed PMID: 16214129.
69. Ho IA, Toh HC, Ng WH, Teo YL, Guo CM, Hui KM, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis. *Stem Cells.* 2013;31(1):146-55. doi: 10.1002/stem.1247. PubMed PMID: 23034897.
70. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156-72. doi: 10.1038/cr.2009.5. PubMed PMID: 19153598; PubMed Central PMCID: PMC4720263.
71. Chaturvedi P, Gilkes DM, Wong CC, Kshitiz, Luo W, Zhang H, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent breast cancer-mesenchymal stem cell bidirectional signaling promotes metastasis. *J Clin Invest.* 2013;123(1):189-205. doi: 10.1172/JCI64993. PubMed PMID: 23318994; PubMed Central PMCID: PMC3533298.

72. 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. doi: 10.1093/carcin/bgr009. PubMed PMID: 21252118; PubMed Central PMCID: PMC3105582.
73. Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol*. 2006;8(12):1369-75. doi: 10.1038/ncb1507. PubMed PMID: 17128264.
74. Condamine T, Ramachandran I, Youn JI, Gabrilovich DI. Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells. *Annu Rev Med*. 2015;66:97-110. doi: 10.1146/annurev-med-051013-052304. PubMed PMID: 25341012; PubMed Central PMCID: PMC34324727.
75. Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*. 2007;109(9):4055-63. doi: 10.1182/blood-2006-10-051060. PubMed PMID: 17197427.
76. Lee JK, Park SR, Jung BK, Jeon YK, Lee YS, Kim MK, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(12):e84256. doi: 10.1371/journal.pone.0084256. PubMed PMID: 24391924; PubMed Central PMCID: PMC3877259.
77. 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. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.001. PubMed PMID: 24513306.
78. Erickson M, Stern R. Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem Res Int*. 2012;2012:893947. doi: 10.1155/2012/893947. PubMed PMID: 22216413; PubMed Central PMCID: PMC3246691.
79. Bono P, Rubin K, Higgins JM, Hynes RO. Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor. *Mol Biol Cell*. 2001;12(4):891-900. PubMed PMID: 11294894; PubMed Central PMCID: PMC32274.
80. Kessler S, Rho H, West G, Fiocchi C, Drazba J, de la Motte C. Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation. *Clin Transl Sci*. 2008;1(1):57-61. doi: 10.1111/j.1752-8062.2008.00025.x. PubMed PMID: 20443819; PubMed Central PMCID: PMC3439585.
81. Reed RK, Laurent UB, Fraser JR, Laurent TC. Removal rate of [3H]hyaluronan injected subcutaneously in rabbits. *Am J Physiol*. 1990;259(2 Pt 2):H532-5. PubMed PMID: 2386226.
82. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*. 1997;272(22):13997-4000. PubMed PMID: 9206724.
83. 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. doi: 10.1016/j.jmb.2012.01.053. PubMed PMID: 22343360.

84. Ouskova G, Spellerberg B, Prehm P. Hyaluronan release from *Streptococcus pyogenes*: export by an ABC transporter. *Glycobiology*. 2004;14(10):931-8. doi: 10.1093/glycob/cwh115. PubMed PMID: 15215229.
85. Vigetti D, Genasetti A, Karousou E, Viola M, Clerici M, Bartolini B, et al. Modulation of hyaluronan synthase activity in cellular membrane fractions. *J Biol Chem*. 2009;284(44):30684-94. doi: 10.1074/jbc.M109.040386. PubMed PMID: 19737932; PubMed Central PMCID: PMC2781622.
86. 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. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08070.x. PubMed PMID: 21362137.
87. 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. doi: 10.1074/jbc.M110.127050. PubMed PMID: 20507985; PubMed Central PMCID: PMC2911313.
88. 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. doi: 10.1164/rccm.200405-652OC. PubMed PMID: 15790861; PubMed Central PMCID: PMC2718450.
89. 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. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4687. PubMed PMID: 20823158.
90. 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. doi: 10.1038/nm742. PubMed PMID: 12134143.
91. Brinck J, Heldin P. Expression of recombinant hyaluronan synthase (HAS) isoforms in CHO cells reduces cell migration and cell surface CD44. *Exp Cell Res*. 1999;252(2):342-51. doi: 10.1006/excr.1999.4645. PubMed PMID: 10527624.
92. Vigetti D, Genasetti A, Karousou E, Viola M, Moretto P, Clerici M, et al. Proinflammatory cytokines induce hyaluronan synthesis and monocyte adhesion in human endothelial cells through hyaluronan synthase 2 (HAS2) and the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) pathway. *J Biol Chem*. 2010;285(32):24639-45. doi: 10.1074/jbc.M110.134536. PubMed PMID: 20522558; PubMed Central PMCID: PMC2915700.
93. 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. doi: 10.1074/jbc.M109.013813. PubMed PMID: 19451652; PubMed Central PMCID: PMC2707203.
94. 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. doi: 10.1002/ijc.22222. PubMed PMID: 17230515.

95. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0053469. PubMed PMID: 23301075; PubMed Central PMCID: PMC3536762.
96. 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. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.037. PubMed PMID: 16730656.
97. 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. doi: 10.1074/jbc.M405918200. PubMed PMID: 15190064.
98. Kultti A, Pasonen-Seppanen S, Jauhiainen M, Rilla KJ, Karna 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. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.03.002. PubMed PMID: 19285976.
99. 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. doi: 10.1074/jbc.M504736200. PubMed PMID: 16014622.
100. 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. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3185. PubMed PMID: 20332231; PubMed Central PMCID: PMC2848908.
101. Twarock S, Reichert C, Peters U, Gorski DJ, Rock K, Fischer JW. Hyperglycaemia and aberrated insulin signalling stimulate tumour progression via induction of the extracellular matrix component hyaluronan. *Int J Cancer*. 2017;141(4):791-804. doi: 10.1002/ijc.30776. PubMed PMID: 28493326.
102. Kretschmer I, Freudenberger T, Twarock S, Yamaguchi Y, Grandoch M, Fischer JW. Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells Modulate Chemokine Expression and Hyaluronan Synthesis in Fibroblasts. *J Biol Chem*. 2016;291(8):4091-106. doi: 10.1074/jbc.M115.708909. PubMed PMID: 26699196; PubMed Central PMCID: PMC4759185.
103. 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. doi: 10.1038/bjc.2011.459. PubMed PMID: 22045192; PubMed Central PMCID: PMC3251882.
104. 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. doi: 10.1016/j.febslet.2005.03.079. PubMed PMID: 15862315.

105. 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. doi: 10.1007/s00280-005-0016-5. PubMed PMID: 16341905.
106. Benitez A, Yates TJ, Shamaldevi N, Bowen T, Lokeshwar VB. Dietary supplement hymecromone and sorafenib: a novel combination for the control of renal cell carcinoma. *J Urol.* 2013;190(1):285-90. doi: 10.1016/j.juro.2012.12.011. PubMed PMID: 23228386; PubMed Central PMCID: PMC5058418.
107. Schutze A, Vogeley C, Gorges T, Twarock S, Butschan J, Babayan A, et al. RHAMM splice variants confer radiosensitivity in human breast cancer cell lines. *Oncotarget.* 2016;7(16):21428-40. doi: 10.18632/oncotarget.7258. PubMed PMID: 26870892; PubMed Central PMCID: PMC5008296.
108. Stern R, Kogan G, Jedrzejewski MJ, Soltes L. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol Adv.* 2007;25(6):537-57. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.001. PubMed PMID: 17716848.
109. Csoka AB, Scherer SW, Stern R. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics.* 1999;60(3):356-61. doi: 10.1006/geno.1999.5876. PubMed PMID: 10493834.
110. Stern R, Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 2006;106(3):818-39. doi: 10.1021/cr050247k. PubMed PMID: 16522010; PubMed Central PMCID: PMC5058418.
111. Lepperdinger G, Strobl B, Kreil G. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem.* 1998;273(35):22466-70. PubMed PMID: 9712871.
112. Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem.* 2004;279(26):26991-7007. doi: 10.1074/jbc.M311838200. PubMed PMID: 15090545.
113. Chao KL, Muthukumar L, Herzberg O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. *Biochemistry.* 2007;46(23):6911-20. doi: 10.1021/bi700382g. PubMed PMID: 17503783.
114. Gasingirwa MC, Thirion J, Mertens-Strijthagen J, Wattiaux-De Coninck S, Flamion B, Wattiaux R, et al. Endocytosis of hyaluronidase-1 by the liver. *Biochem J.* 2010;430(2):305-13. doi: 10.1042/BJ20100711. PubMed PMID: 20572808.
115. Kramer MW, Escudero DO, Lokeshwar SD, Golshani R, Ekwenna OO, Acosta K, et al. Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis. *Cancer.* 2011;117(6):1197-209. doi: 10.1002/cncr.25565. PubMed PMID: 20960509; PubMed Central PMCID: PMC3025265.
116. Gomez CS, Gomez P, Knapp J, Jorda M, Soloway MS, Lokeshwar VB. Hyaluronic acid and HYAL-1 in prostate biopsy specimens: predictors of biochemical

- recurrence. *J Urol.* 2009;182(4):1350-6. doi: 10.1016/j.juro.2009.06.070. PubMed PMID: 19683287; PubMed Central PMCID: PMCPMC2828051.
117. Eissa S, Zohny SF, Shehata HH, Hegazy MG, Salem AM, Esmat M. Urinary retinoic acid receptor-beta2 gene promoter methylation and hyaluronidase activity as noninvasive tests for diagnosis of bladder cancer. *Clin Biochem.* 2012;45(6):402-7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.01.010. PubMed PMID: 22286019.
118. Poola I, Abraham J, Marshalleck JJ, Yue Q, Lokeshwar VB, Bonney G, et al. Molecular risk assessment for breast cancer development in patients with ductal hyperplasias. *Clin Cancer Res.* 2008;14(4):1274-80. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4053. PubMed PMID: 18281563.
119. Tan JX, Wang XY, Su XL, Li HY, Shi Y, Wang L, et al. Upregulation of HYAL1 expression in breast cancer promoted tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *PLoS One.* 2011;6(7):e22836. doi: 10.1371/journal.pone.0022836. PubMed PMID: 21829529; PubMed Central PMCID: PMCPMC3145763.
120. Lokeshwar VB, Schroeder GL, Carey RI, Soloway MS, Iida N. Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. *J Biol Chem.* 2002;277(37):33654-63. doi: 10.1074/jbc.M203821200. PubMed PMID: 12084718.
121. Lokeshwar VB, Estrella V, Lopez L, Kramer M, Gomez P, Soloway MS, et al. HYAL1-v1, an alternatively spliced variant of HYAL1 hyaluronidase: a negative regulator of bladder cancer. *Cancer Res.* 2006;66(23):11219-27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1121. PubMed PMID: 17145867.
122. Siiskonen H, Poukka M, Tynnela-Korhonen K, Sironen R, Pasonen-Seppanen S. Inverse expression of hyaluronidase 2 and hyaluronan synthases 1-3 is associated with reduced hyaluronan content in malignant cutaneous melanoma. *BMC Cancer.* 2013;13:181. doi: 10.1186/1471-2407-13-181. PubMed PMID: 23560496; PubMed Central PMCID: PMCPMC3626669.
123. Nykopp TK, Rilla K, Tammi MI, Tammi RH, Sironen R, Hamalainen K, et al. Hyaluronan synthases (HAS1-3) and hyaluronidases (HYAL1-2) in the accumulation of hyaluronan in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer.* 2010;10:512. doi: 10.1186/1471-2407-10-512. PubMed PMID: 20875124; PubMed Central PMCID: PMCPMC2956733.
124. Li R, Todd NW, Qiu Q, Fan T, Zhao RY, Rodgers WH, et al. Genetic deletions in sputum as diagnostic markers for early detection of stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(2 Pt 1):482-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1593. PubMed PMID: 17255269.
125. Langevin SM, Koestler DC, Christensen BC, Butler RA, Wiencke JK, Nelson HH, et al. Peripheral blood DNA methylation profiles are indicative of head and neck squamous cell carcinoma: an epigenome-wide association study. *Epigenetics.* 2012;7(3):291-9. doi: 10.4161/epi.7.3.19134. PubMed PMID: 22430805; PubMed Central PMCID: PMCPMC3335952.
126. Ohnuma S, Miura K, Horii A, Fujibuchi W, Kaneko N, Gotoh O, et al. Cancer-associated splicing variants of the CDCA1 and MSMB genes expressed in cancer cell lines and surgically resected gastric cancer tissues. *Surgery.* 2009;145(1):57-68. doi: 10.1016/j.surg.2008.08.010. PubMed PMID: 19081476.

127. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* 2013;13(1):89. doi: 10.1186/1475-2867-13-89. PubMed PMID: 24004445; PubMed Central PMCID: PMC3849184.
128. West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science.* 1985;228(4705):1324-6. PubMed PMID: 2408340.
129. Cui X, Xu H, Zhou S, Zhao T, Liu A, Guo X, et al. Evaluation of angiogenic activities of hyaluronan oligosaccharides of defined minimum size. *Life Sci.* 2009;85(15-16):573-7. doi: 10.1016/j.lfs.2009.08.010. PubMed PMID: 19720068.
130. McAtee CO, Barycki JJ, Simpson MA. Emerging roles for hyaluronidase in cancer metastasis and therapy. *Adv Cancer Res.* 2014;123:1-34. doi: 10.1016/B978-0-12-800092-2.00001-0. PubMed PMID: 25081524; PubMed Central PMCID: PMC4445717.
131. 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. PubMed PMID: 11781369; PubMed Central PMCID: PMC2196009.
132. Xu H, Ito T, Tawada A, Maeda H, Yamanokuchi H, Isahara K, et al. Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J Biol Chem.* 2002;277(19):17308-14. doi: 10.1074/jbc.M112371200. PubMed PMID: 11864979.
133. Toida T, Ogita Y, Suzuki A, Toyoda H, Imanari T. Inhibition of hyaluronidase by fully O-sulfonated glycosaminoglycans. *Arch Biochem Biophys.* 1999;370(2):176-82. doi: 10.1006/abbi.1999.1395. PubMed PMID: 10510275.
134. Li S, Taylor KB, Kelly SJ, Jedrzejewski MJ. Vitamin C inhibits the enzymatic activity of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *J Biol Chem.* 2001;276(18):15125-30. doi: 10.1074/jbc.M011102200. PubMed PMID: 11278838.
135. Botzki A, Rigden DJ, Braun S, Nukui M, Salmen S, Hoehstetter J, et al. L-Ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. *J Biol Chem.* 2004;279(44):45990-7. doi: 10.1074/jbc.M406146200. PubMed PMID: 15322107.
136. ZZuIV. Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung - ZZuIV): Bundesministerium für Justiz und für Verbraucherschutz; 2017 [20.09.2017]. Available from: https://www.gesetze-im-internet.de/zzuiv_1998/BJNR023100998.html.
137. Quah BJ, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc.* 2007;2(9):2049-56. doi: 10.1038/nprot.2007.296. PubMed PMID: 17853860.
138. 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. PubMed PMID: 1710634.
139. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85. PubMed PMID: 3843705.
140. Kim SI, Kwak JH, Na HJ, Kim JK, Ding Y, Choi ME. Transforming growth factor-beta (TGF-beta1) activates TAK1 via TAB1-mediated autophosphorylation, independent of TGF-beta receptor kinase activity in mesangial cells. *J Biol Chem*. 2009;284(33):22285-96. doi: 10.1074/jbc.M109.007146. PubMed PMID: 19556242; PubMed Central PMCID: PMCPMC2755952.
141. Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med*. 2005;11(11):1173-9. doi: 10.1038/nm1315. PubMed PMID: 16244651.
142. 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 (Hoboken)*. 2011;68(12):671-93. doi: 10.1002/cm.20544. PubMed PMID: 22031535; PubMed Central PMCID: PMCPMC3240717.
143. Dai G, Freudenberger T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, et al. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol*. 2007;171(5):1451-61. doi: 10.2353/ajpath.2007.070136. PubMed PMID: 17982124; PubMed Central PMCID: PMCPMC2043507.
144. Rock 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. doi: 10.1074/jbc.M112.353151. PubMed PMID: 22493503; PubMed Central PMCID: PMCPMC3370189.
145. 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. PubMed PMID: 14747056.
146. Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol*. 2008;18(4):288-95. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.005. PubMed PMID: 18468453.
147. Karvinen S, Kosma VM, Tammi MI, Tammi R. Hyaluronan, CD44 and versican in epidermal keratinocyte tumours. *Br J Dermatol*. 2003;148(1):86-94. PubMed PMID: 12534600.
148. Tan JX, Wang XY, Li HY, Su XL, Wang L, Ran L, et al. HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer. *Int J Cancer*. 2011;128(6):1303-15. doi: 10.1002/ijc.25460. PubMed PMID: 20473947.
149. Sauer L, Gitenay D, Vo C, Baron VT. Mutant p53 initiates a feedback loop that involves Egr-1/EGF receptor/ERK in prostate cancer cells. *Oncogene*.

- 2010;29(18):2628-37. doi: 10.1038/onc.2010.24. PubMed PMID: 20190820; PubMed Central PMCID: PMCPMC2865566.
150. Lokeshwar VB, Gomez P, Kramer M, Knapp J, McCornack MA, Lopez LE, et al. Epigenetic regulation of HYAL-1 hyaluronidase expression. identification of HYAL-1 promoter. *J Biol Chem.* 2008;283(43):29215-27. doi: 10.1074/jbc.M801101200. PubMed PMID: 18718911; PubMed Central PMCID: PMCPMC2570869.
 151. Li X, Jiang S, Tapping RI. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine.* 2010;49(1):1-9. doi: 10.1016/j.cyto.2009.08.010. PubMed PMID: 19775907; PubMed Central PMCID: PMCPMC2808458.
 152. Ebid R, Lichtnekert J, Anders HJ. Hyaluronan is not a ligand but a regulator of toll-like receptor signaling in mesangial cells: role of extracellular matrix in innate immunity. *ISRN Nephrol.* 2014;2014:714081. doi: 10.1155/2014/714081. PubMed PMID: 24967246; PubMed Central PMCID: PMCPMC4045461.
 153. Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(19):7421-6. doi: 10.1073/pnas.1201193109. PubMed PMID: 22532668; PubMed Central PMCID: PMCPMC3358893.
 154. Lugade AA, Bianchi-Smiraglia A, Pradhan V, Elkin G, Murphy TF, Thanavala Y. Lipid motif of a bacterial antigen mediates immune responses via TLR2 signaling. *PLoS One.* 2011;6(5):e19781. doi: 10.1371/journal.pone.0019781. PubMed PMID: 21611194; PubMed Central PMCID: PMCPMC3096640.
 155. Taylor KR, Yamasaki K, Radek KA, Di Nardo A, Goodarzi H, Golenbock D, et al. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J Biol Chem.* 2007;282(25):18265-75. doi: 10.1074/jbc.M606352200. PubMed PMID: 17400552.
 156. Wortzel I, Seger R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer.* 2011;2(3):195-209. doi: 10.1177/1947601911407328. PubMed PMID: 21779493; PubMed Central PMCID: PMCPMC3128630.
 157. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* 2010;277(1):2-21. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x. PubMed PMID: 19843174.
 158. Ouyang C, Nie L, Gu M, Wu A, Han X, Wang X, et al. Transforming growth factor (TGF)-beta-activated kinase 1 (TAK1) activation requires phosphorylation of serine 412 by protein kinase A catalytic subunit alpha (PKACalpha) and X-linked protein kinase (PRKX). *J Biol Chem.* 2014;289(35):24226-37. doi: 10.1074/jbc.M114.559963. PubMed PMID: 25028512; PubMed Central PMCID: PMCPMC4148853.
 159. Rawlins P, Mander T, Sadeghi R, Hill S, Gammon G, Foxwell B, et al. Inhibition of endotoxin-induced TNF-alpha production in macrophages by 5Z-7-oxozeaenol and other fungal resorcylic acid lactones. *Int J Immunopharmacol.* 1999;21(12):799-814. PubMed PMID: 10606001.

160. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. 2001;412(6844):346-51. doi: 10.1038/35085597. PubMed PMID: 11460167.
161. Israel A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(3):a000158. doi: 10.1101/cshperspect.a000158. PubMed PMID: 20300203; PubMed Central PMCID: PMC2829958.
162. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680-4. doi: 10.1038/sj.onc.1209954. PubMed PMID: 17072321.
163. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):301-10. doi: 10.1038/nrc780. PubMed PMID: 12001991.
164. Melisi D, Xia Q, Paradiso G, Ling J, Moccia T, Carbone C, et al. Modulation of pancreatic cancer chemoresistance by inhibition of TAK1. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(15):1190-204. doi: 10.1093/jnci/djr243. PubMed PMID: 21743023; PubMed Central PMCID: PMC3149044.
165. Martin SE, Wu ZH, Gehlhaus K, Jones TL, Zhang YW, Guha R, et al. RNAi screening identifies TAK1 as a potential target for the enhanced efficacy of topoisomerase inhibitors. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11(8):976-86. PubMed PMID: 21834757; PubMed Central PMCID: PMC3401936.
166. Singh A, Sweeney MF, Yu M, Burger A, Greninger P, Benes C, et al. TAK1 inhibition promotes apoptosis in KRAS-dependent colon cancers. *Cell*. 2012;148(4):639-50. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.033. PubMed PMID: 22341439; PubMed Central PMCID: PMC3291475.
167. 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. PubMed PMID: 11241304.
168. Wong TY, Chang CH, Yu CH, Huang LLH. Hyaluronan keeps mesenchymal stem cells quiescent and maintains the differentiation potential over time. *Aging Cell*. 2017;16(3):451-60. doi: 10.1111/ace.12567. PubMed PMID: 28474484; PubMed Central PMCID: PMC5418204.
169. Chung C, Burdick JA. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(2):243-54. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0067. PubMed PMID: 19193129; PubMed Central PMCID: PMC2678568.
170. Ducale AE, Ward SI, Dechert T, Yager DR. Regulation of hyaluronan synthase-2 expression in human intestinal mesenchymal cells: mechanisms of interleukin-1beta-mediated induction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(3):G462-70. doi: 10.1152/ajpgi.00494.2004. PubMed PMID: 15677552.
171. 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. doi: 10.1006/excr.2002.5508. PubMed PMID: 11978005.

172. James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:684736. doi: 10.1155/2013/684736. PubMed PMID: 24416618; PubMed Central PMCID: PMC3874981.
173. Chowdhury R, Webber JP, Gurney M, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget*. 2015;6(2):715-31. doi: 10.18632/oncotarget.2711. PubMed PMID: 25596732; PubMed Central PMCID: PMC3874981.
174. Logothetis CJ, Lin SH. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(1):21-8. doi: 10.1038/nrc1528. PubMed PMID: 15630412.
175. Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res*. 2010;8(5):629-42. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0139. PubMed PMID: 20460404.
176. Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol*. 1999;147(3):631-44. PubMed PMID: 10545506; PubMed Central PMCID: PMC3874981.
177. Mele V, Muraro MG, Calabrese D, Pfaff D, Amatruda N, Amicarella F, et al. Mesenchymal stromal cells induce epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through the expression of surface-bound TGF-beta. *Int J Cancer*. 2014;134(11):2583-94. doi: 10.1002/ijc.28598. PubMed PMID: 24214914; PubMed Central PMCID: PMC3874981.
178. Khan AI, Kerfoot SM, Heit B, Liu L, Andonegui G, Ruffell B, et al. Role of CD44 and hyaluronan in neutrophil recruitment. *J Immunol*. 2004;173(12):7594-601. PubMed PMID: 15585887.
179. Li T, Zhang C, Ding Y, Zhai W, Liu K, Bu F, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells promote proliferation and migration in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of the ERK pathway. *Oncol Rep*. 2015;34(3):1469-77. doi: 10.3892/or.2015.4109. PubMed PMID: 26151310.
180. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer*. 2010;127(10):2323-33. doi: 10.1002/ijc.25440. PubMed PMID: 20473928.
181. Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A, Seckinger A, Vohrer J, Schmal H, et al. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Eng*. 2007;13(1):111-21. doi: 10.1089/ten.2006.0114. PubMed PMID: 17518585.
182. Ryan AE, Lohan P, O'Flynn L, Treacy O, Chen X, Coleman C, et al. Chondrogenic differentiation increases antidonor immune response to allogeneic mesenchymal stem cell transplantation. *Mol Ther*. 2014;22(3):655-67. doi: 10.1038/mt.2013.261. PubMed PMID: 24184966; PubMed Central PMCID: PMC3874981.

183. Wang H, Chen T, Ding T, Zhu P, Xu X, Yu L, et al. Adipogenic differentiation alters the immunoregulatory property of mesenchymal stem cells through BAFF secretion. *Hematology*. 2011;16(5):313-23. doi: 10.1179/102453311X13085644679944. PubMed PMID: 21902897.
184. Yang Y, Bucan V, Baehre H, von der Ohe J, Otte A, Hass R. Acquisition of new tumor cell properties by MSC-derived exosomes. *Int J Oncol*. 2015;47(1):244-52. doi: 10.3892/ijo.2015.3001. PubMed PMID: 25963929.
185. Zhang XH, Giuliano M, Trivedi MV, Schiff R, Osborne CK. Metastasis dormancy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(23):6389-97. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0838. PubMed PMID: 24298069; PubMed Central PMCID: PMC3878717.
186. Liwnicz BH, Rubinstein LJ. The pathways of extraneural spread in metastasizing gliomas: a report of three cases and critical review of the literature. *Hum Pathol*. 1979;10(4):453-67. PubMed PMID: 381159.
187. Muller C, Holtschmidt J, Auer M, Heitzer E, Lamszus K, Schulte A, et al. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Sci Transl Med*. 2014;6(247):247ra101. doi: 10.1126/scitranslmed.3009095. PubMed PMID: 25080476.
188. Asanuma M, Aoyama T, Sakai K, Asano K, Uehara T, Hongo K. Hematogenous extraneural metastasis of the germinomatous component of a pineal mixed germ cell tumor. *Brain Tumor Pathol*. 2012;29(4):245-50. doi: 10.1007/s10014-011-0080-y. PubMed PMID: 22286191; PubMed Central PMCID: PMC3493664.
189. Itoyama Y, Kochi M, Yamashiro S, Yoshizato K, Kuratsu J, Ushio Y. Combination chemotherapy with cisplatin and etoposide for hematogenous spinal metastasis of intracranial germinoma--case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1993;33(1):28-31. PubMed PMID: 7680780.

6. Appendix

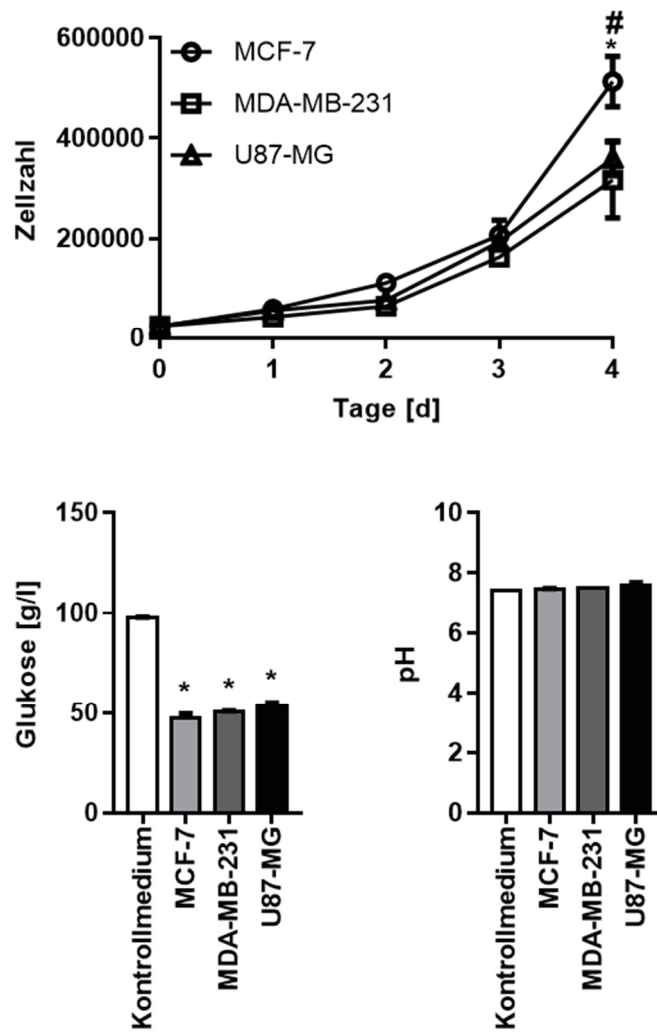


Abbildung 38: Charakterisierung des Wachstumsverhaltens und des Überstandes der Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U87-MG

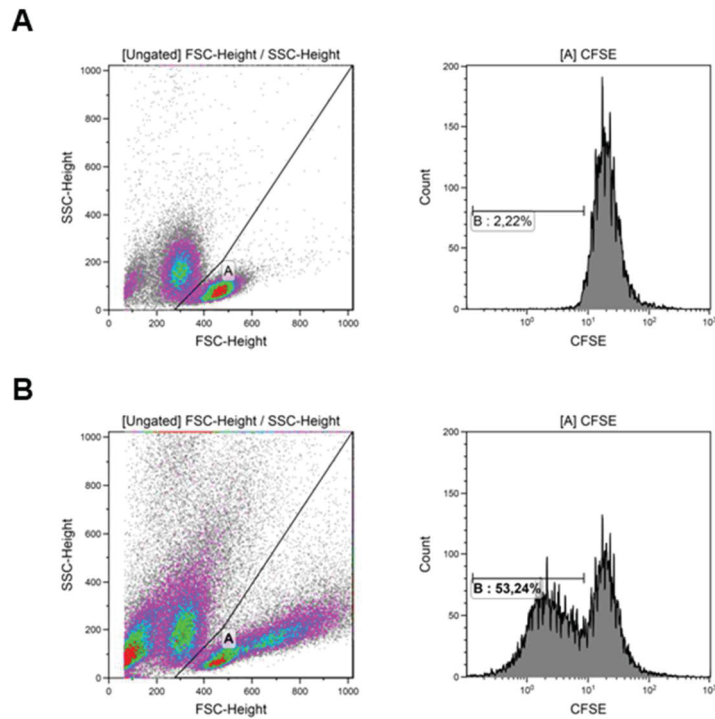


Abbildung 39: Einfluss einer Stimulation von CD3⁺ T-Zellsuspension mit α CD3 und α CD28
 Kryokonservierte CD3⁺ T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und mit Antikörpern, die gegen die Proteine CD3 und CD28 gerichtet waren, stimuliert. Die T-Zellen wurden im Anschluss für 6 d bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die proliferative Rate wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Punktdiagramme und Histogramme von **A**, unstimulierten und **B**, stimulierten T-Zellen.

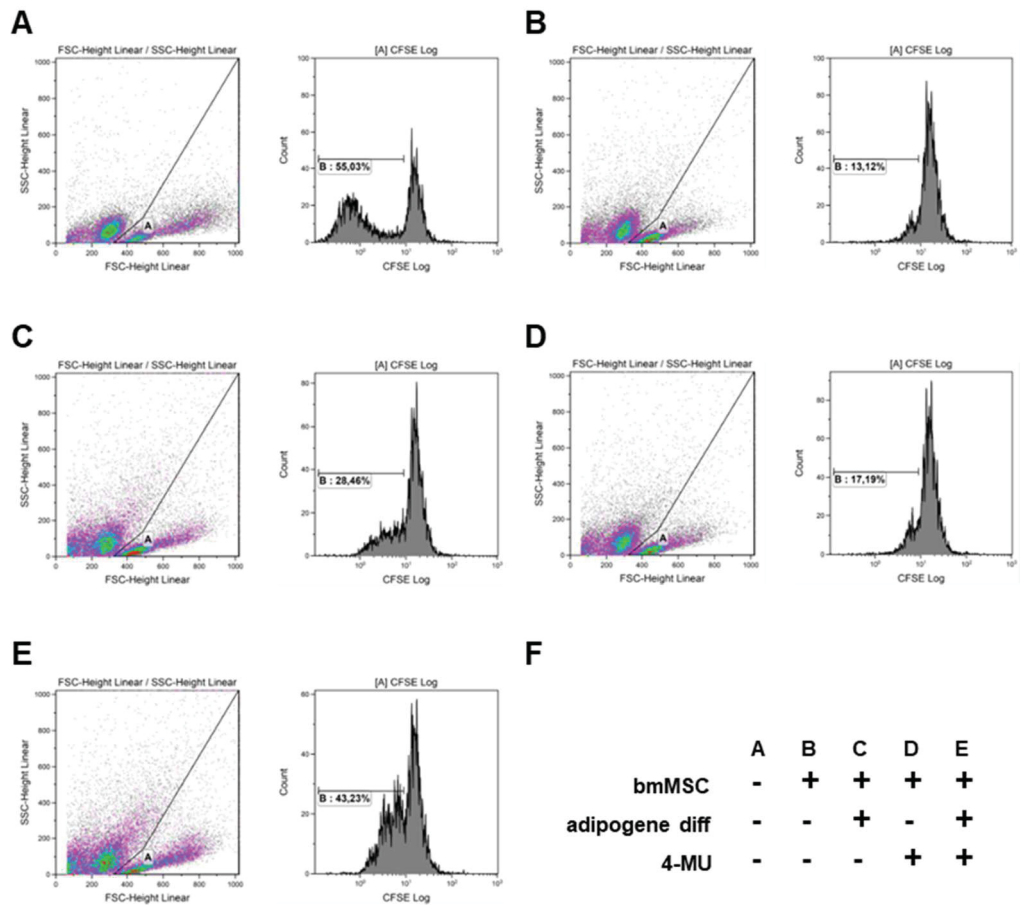
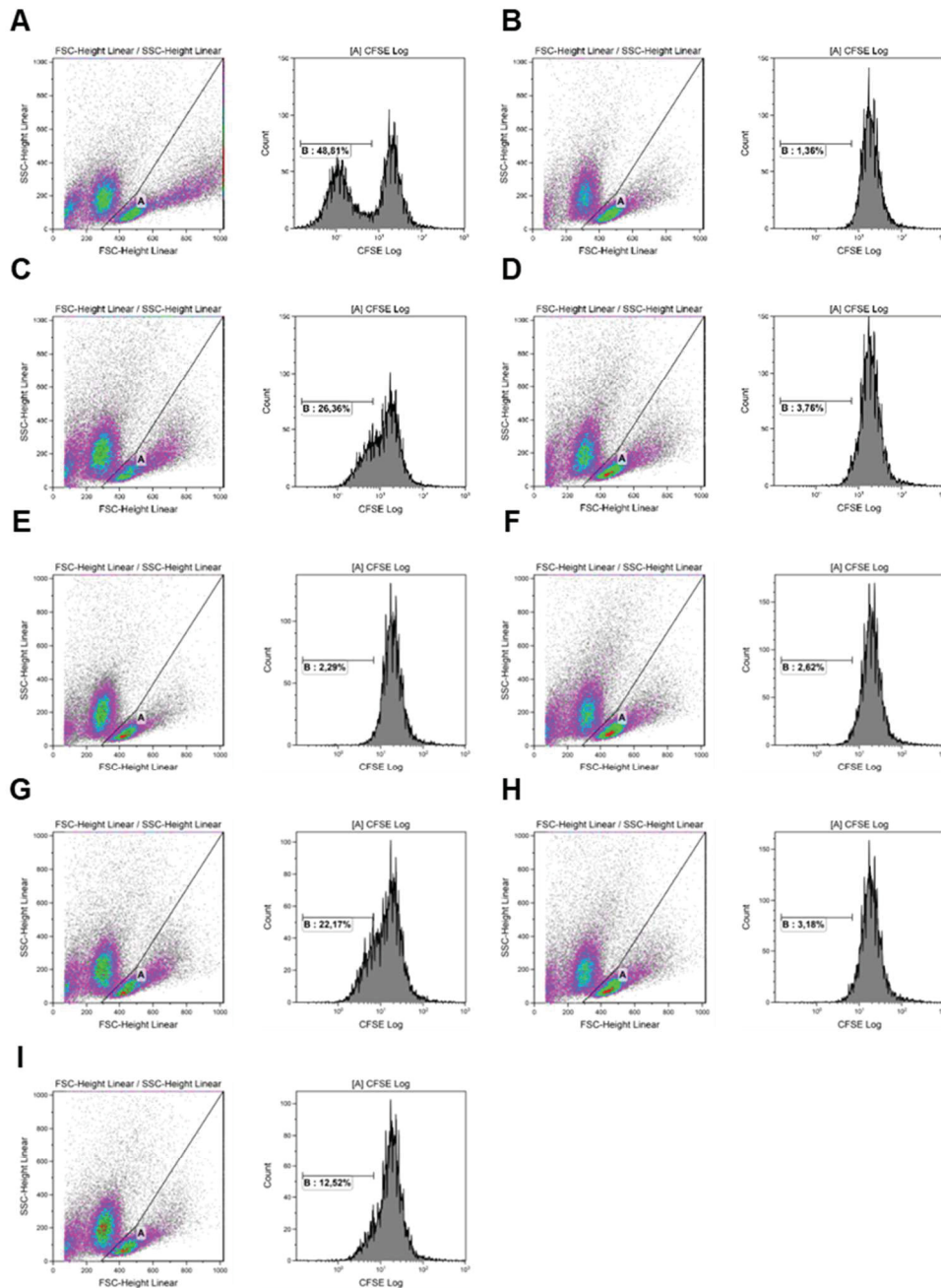


Abbildung 40: Einfluss der adipogenen Differenzierung auf das immunmodulatorische Potential mesenchymaler Stammzellen

A – E, zeigt repräsentative Punktdiagramme und Histogramme der in Abbildung 33 gezeigten Ergebnisse bezüglich der proliferativen Rate CD3⁺ T-Zellen, **F**, kennzeichnet die jeweilige Behandlung der MSCs, bevor die T-Zellen ausgesät wurden.



J

| | MDA-MB-231 ÜS | | | | | | | U87-MG ÜS | |
|----------------|---------------|---|---|---|---|---|---|-----------|---|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
| MSC | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| adipogene diff | - | - | + | - | + | - | + | - | + |
| 4-MU | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| supernatant | - | - | - | + | + | + | + | + | + |

Abbildung 41: Durch MDA-MB-231 konditioniertes Medium erhält das immunmodulatorische Potential mesenchymaler Stammzellen
A – I, zeigt repräsentative Punktdiagramme und Histogramme der in Abbildung 34 gezeigten Ergebnisse bezüglich der proliferativen Rate CD3⁺ T-Zellen, **F**, kennzeichnet die jeweilige Behandlung der MSCs, bevor die T-Zellen ausgesät wurden. **ÜS** = Überstand.

7. Veröffentlichungen

7.1. Fachzeitschriften

Schutze A, **Vogelely C**, Gorges T, Twarock S, Butschan J, Babayan A, Klein D, Knauer S, Metzen E, Müller V, Jendrossek V, Pantel K, Milde-Langosch K, Fischer JW und Röck K. RHAMM splice variants confer radiosensitivity in human breast cancer cell lines. *Oncotarget*. 2016;7(16):21428-40. doi: 10.18632/oncotarget.7258. PubMed PMID: 26870892; PubMed Central PMCID: PMC5008296

7.2. Kongressbeiträge

Vogelely C, Twarock S, Kellner MB, Reiners O, Hippe A, Zipper P, Homey B, Reifenberger J, Fischer JW, Röck K. Targeting the extracellular matrix – Dependence of squamous skin carcinomas on the hyaluronan degrading enzyme Hyal1. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2017; 390 (Suppl 1): S66 (P204)

8. Lebenslauf

Person

| | |
|---------------------|-------------------|
| Name | Christian Vogeley |
| Geburtsdatum | 22.03.1988 |
| Geburtsort | Dormagen |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |

Promotion

| | |
|-------------------|--|
| 03/2014 – 03/2018 | Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf, Doktorvater Prof. Dr. Jens W. Fischer Thema: Die Rolle der Hyaluronsäure in der Tumorprogression und der Tumor-Stroma-Interaktion |
| 04/2015 – 12/2017 | Stipendium der Düsseldorf School on Oncology Thema: „Implication of hyaluronan on the relationship between mesenchymal stem cells and tumor progression“ |

Akademische Laufbahn

| | |
|-------------------|---|
| 10/2011 – 02/2014 | M. Sc Biowissenschaften an der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster Gesamtnote: 1,2 Masterarbeit: „Structural modifications of HPV-16 during entry: the role of proteolysis, localization and redox environment“ (1,2) Institut für Molekulare Virologie & Institut für Medizinische Biochemie |
| 09/2012 – 03/2013 | Auslandsaufenthalt an der Universität von Stockholm im Rahmen des ERASMUS-Förderprogramms |
| 10/2008 – 09/2011 | B. Sc. Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Gesamtnote: 1,8 Bachelorarbeit: „Kinetochorproteine und Zellalterung“ (2,0) Institut für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen |

Schulische Laufbahn

| | |
|-------------------|---|
| 08/1988 – 06/2007 | Bettina-von-Arnim-Gymnasium Dormagen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife Gesamtnote: 2,9 |
|-------------------|---|

9. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Jens W. Fischer für die Betreuung und die Ermöglichung, diese Arbeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. Matthias Kassack bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Aufgabe des Mentors.

Bei Katharina Röck möchte ich mich besonders für die intensive Betreuung bedanken. Die häufigen Gespräche und die stetige Einbringung neuer Ideen haben zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen.

Besonderer Dank gilt auch Sören Twarock, der stets hilfsbereit war und mir bei Problemen jeglicher Art zur Seite stand. Insbesondere für die sehr ausführliche Korrektur dieser Doktorarbeit bedanke ich mich.

Herrn Prof. Dr. Roland Meisel, Özer Degistirici und Silke Stuhlsatz der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf möchte ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Nicht nur, dass mir primärisolierte MSCs aus humanen Knochenmark und CD3⁺ T-Zellen zur Verfügung gestellt wurden, vielmehr die fachliche Kompetenz im Umgang mit mesenchymalen Stammzellen haben mir die Laborarbeit erleichtert.

Herrn Prof. Homey und Frau Dr. Julia Reifenberger von der Klinik der Dermatologie des Universitätsklinikums Düsseldorf bedanke ich mich für die erfolgreiche Kooperation und Verfügungstellung humaner Biopsien.

Der Düsseldorf School of Oncology danke ich für die Finanzierung meiner Doktorarbeit. Des Weiteren wurde mir ein sehr umfangreiches Netzwerk zur Verfügung gestellt, welches ermöglicht hat, dass fachliche Probleme schneller gelöst werden konnten.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die schöne Zeit und tolle Zusammenarbeit. Für sämtliche administrativen Probleme kannten Erika Lohmann und Karin Montag immer eine Lösung und im Labor waren Kerstin Freidel, Petra Rompel, Annika Zimmermann, Beate Weyrauther, Irmhild Rüter und Kirsten Bartkowski eine große Hilfe. Für die fachlichen Diskussionen und aufmunternden Gespräche bei einem koffeinhaltigen Heißgetränk möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Jessica Selig, Oliver Reiners, Christina Reichert, Florian Funk und Alexandra Schütze bedanken.

Meiner Familie und Freunden danke ich für die Zeit abseits der Arbeit, die immer an mich geglaubt haben und keinen Zweifel am Gelingen dieser Arbeit haben aufkommen lassen. Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Stefanie Löhnes, die in all den Jahren hinter mir stand, mich fortwährend unterstützt und immer großes Verständnis aufgebracht hat, wenn aufgrund der Arbeit die gemeinsame Zeit zu kurz kam.

10. Eidesstattliche Erklärung

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 07. Februar 2018

Christian Vogeley