Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Einfluss von Hyaluronan auf die Pathophysiologie von Plattenepithelkarzinomen der Haut

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Maximilian Benjamin Kellner 2021

Meinem Vater Günther Kellner

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Röck K, Kellner MB, Hippe A, Homey B, Fischer JW. *Development of squamous skin carcinomas is supported by hyaluronan*. Naunyn-Schmiedeberg´s Arch Pharmacol 2012; 3 (Suppl 1): S76 (331)

Zusammenfassung

Das Plattenepithelkarzinom (SCC) als zweithäufigster maligner Hauttumor ist stark mit chronischer UVB-Belastung assoziiert. UVB-induzierte Veränderungen der extrazellulären Matrix (EZM) tragen zu spezifischem Verhalten von Tumorzellen und -stroma bei. Hyaluronan (HA), ein Glykosaminoglykan, ist eine Hauptkomponente der EZM. Die HA-Synthese erfolgt durch die membranständigen HA-Synthase-Isoenzyme (HAS) 1-3, in kleinere Fragmente degradiert wird HA durch die Hyaluronidasen (HYAL) 1 und 2. HA und HA-Fragmente sind für die Regulation vieler unterschiedlicher zellulärer Mechanismen wie Proliferation, Migration und Apoptose relevant. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von HA auf die Tumorprogression von UVBinduzierten SCCs. Immunhistochemisch untersuchte Schnitte von humanen SCCs wiesen einen erhöhten HA-Gehalt gegenüber gesunder Haut auf. Die Analyse der mRNA-Expression in humanen SCCs im Vergleich zu gesunder Haut zeigte eine deutliche Hochregulation von HAS3 und HYAL1 und 2. Das gleiche Expressionsmuster traf in vitro für SCC-Zellen (SCCZ) verglichen mit normalen humanen Keratinozyten (NHEK) zu, zudem war der HA-Rezeptor RHAMM in SCCZ überexprimiert. Der HA-Gehalt im Überstand von SCC-Zellen war gegenüber NHEKs signifikant erhöht. Zur Beurteilung des Einflusses von HA auf die UV-induzierte Tumorgenese in vivo wurden Mäuse mit UVB-Licht (dreimal wöchentlich, 80 mJ/cm²) bestrahlt und die Anzahl der entstandenen Tumore visuell analysiert. Die affinitätshistochemische Analyse der HA-Menge ergab einen stark erhöhten HA-Gehalt in SCCs im Vergleich zu unbestrahlter Mausepidermis. Die gleichzeitige Gabe des HA-Synthese-Inhibitors 4-MU während der Bestrahlung führte zu signifikant reduzierter Tumormasse verglichen mit den bestrahlten Kontrolltieren. In vitro reduzierte die 4-MU-Behandlung die HA-Menge im Überstand von Zellkulturen der SCCZ, weiterhin wurde eine verringerte Proliferation und Migration nachgewiesen. 4-MU zeigte außerdem eine signifikant proapoptotische Wirkung auf SCCZ. Der Zusatz von HA-Fragmenten verschiedener Größe (Oktamere, Fragmente von 150 – 1000 kD, Gemisch aus niedermolekularen Fragmenten) zu SCCZ-Kulturen hatte keinen Einfluss auf die Proliferationsrate. LMW-HA führte in NHEK zu erhöhter IL-6 Expression, IL-6 selbst bewirkte in SCCZ-Kulturen einen Rückgang der Zellzahl. Zusammengefasst haben Veränderungen der HA-Matrix einen essentiellen Einfluss auf Wachstum, Überleben und Malignität UV-induzierter SCCs. Dieser Effekt könnte in direktem Zusammenhang mit einer vermehrten HAS3 und HYAL1-2-Expression, sowie erhöhter HA-Synthese und -Fragmentierung in SCCs der Haut und einer Modulation deren parakriner Interaktionen mit NHEK stehen.

Summary

Squamous Cell Carcinoma (SCC) is the second most common skin cancer with a strong association to UVB-irradiation. UVB-induced alterations of the extracellular matrix (ECM) contribute to specific behaviour from tumor cells and -stroma. The glycosaminoglycan hyaluronan (HA) is a main component of the ECM. HA-synthesis is accomplished by membrane linked isoenzymes (HAS1-3) and its degradation to smaller fragments by hyaluronidases (HYAL) 1 and 2. HA and HA-fragments are relevant to many different cellular mechanisms like proliferation, migration and apoptosis. The aim of this study was to analyze the influence of HA on tumor progression of UV-induced SCC. Affinity histochemistry revealed an increase of HA-quantity in human SCC versus healthy skin. The analysis of mRNA-Expression of human SCC and healthy skin showed distinct upregulation of HAS3 and the HYALs 1 and 2. A similar expression pattern was demonstrated in vitro by comparing SCC-Cells (SCCZ) to normal human epidermal keratinocytes (NHEK), moreover the HA-receptor RHAMM was overexpressed in SCCZ. HA-content in the supernatant of SCCZ was significantly increased in comparison to NHEK. To evaluate the influence of HA on UVB-induced tumor progression in vivo mice were irradiated with UVB (three times a week, 80 mJ/cm²) followed by a visual analysis of the developing tumors. The HA-quantity was heavily elevated in SCCs in comparison to mouse epidermis without irradiation as detected by affinity histochemistry. Under administration of the HA-synthesis inhibitor 4-MU irradiated mice developed significantly less tumor mass than irradiated mice without 4-MU treatment. In vitro 4-MU-treatment of SCCZ reduced the HA-content in the supernatant, furthermore a decreased proliferation and migration was shown. Additionally 4-MU demonstrated significantly proapoptotic effects on SCCZ. HA-fragments added to SCC-cell cultures have shown to be proliferatively neutral on a distribution from octameres over 150 kD up to 1000 kD as well as in a mixture of low molecular weight (LMW). However, LMW-HA led to increased IL-6 expression in NHEK, while IL-6 itself caused a decreased cell count of SCCZ. In conclusion alterations of the HA-matrix have an essential impact on growth, survival and malignancy of UV-induced SCC. This effect could be directly connected to an elevated HAS3 and HYAL1-2 expression together with increased HA synthesis and fragmentation in SCCs of the skin and a modulation of their paracrine interactions with NHEKs.

Inhaltsverzeichnis

Zusa	mme	enfassungI
Sum	mary	/ II
Inha	ltsve	rzeichnis III
Abki	ürzun	gsverzeichnis VII
Abbi	ildun	gsverzeichnis IX
Tabe	ellenv	verzeichnisX
1	Einle	eitung1
	1.1	Haut 1
	1.2	Plattenepithelkarzinom der Haut 2
	1.3	Extrazelluläre Matrix
1.4		Hyaluronan 4
		1.4.1 Struktur
		1.4.2 Metabolismus
		1.4.3 Physiologie und Pathophysiologie5
	1.5	4-Methylumbelliferon
2	Ziele	e der Arbeit
3	Mate	erial und Methoden9
	3.1	Zellkultur
	3.2	Proteinbestimmung10
	3.3	Bestimmung der HA-Menge10
	3.4	HA-Größenausschlusschromatographie10
	3.5	Herstellung von HA-Fragmenten durch Ultraschall-Bestrahlung11
	3.6	Agarose-Gelelektrophorese11
	3.7	Migrationsmessung mit einer modifizierten Boyden-Kammer11

3.	8	Prolife	rationsmessung durch [³ H]-Thymidininkorporation	.12
3.	9	Durchflusszytometrie12		
		3.9.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	12
		3.9.2	Proliferationsmessung	13
		3.9.3	Apoptose	13
3.	10	Immun	nzytochemie	.14
3.	11	Gesam	t RNA-Isolation und Messung der mRNA-Konzentration	.15
3.	12	cDNA-	Synthese und <i>realtime</i> RT quantitative PCR (qRT-PCR)	.15
		3.12.1	cDNA-Synthese	15
		3.12.2	Realtime RT quantitative PCR	15
3.	13	SDS-PA	AGE und Western Blot	.16
3.	14	Mausn	nodel zum Einfluss von UV-Strahlung auf die Genese von SCC	.17
3.	15	Immun	nhistochemie	.17
		3.15.1	Humane Hautproben	17
		3.15.2	Murine Hautproben	18
		3.15.3	Hyaluronanspezifische Färbung	18
		3.15.4	Quantitative Auswertung mit dem Programm ImageJ	19
3.	16	Metaa	nalyse von Microarrays gesunder Epidermis und SCCs	.19
3.	17	Statisti	ik	.20
Er	rge	bnisse		22
4.	1	Matrix	-assoziierte Gene in SCC	.22
4.	2	HA und	d am HA-Metabolismus beteiligte Proteine in SCC in vivo	.23
4.	3	HA und	d am HA-Metabolismus beteiligte Proteine in SCCZ in vitro	.24
		4.3.1	Evaluation der HA-Menge	25
		4.3.2	Analyse HA-synthetisierender und -degradierender Proteine	25
		4.3.3	Analyse HA-spezifischer Rezeptoren	27
		4.3.4	Unterschiede in der HA-Größendistribution	28
4.	4	Einflus	s der HA-Matrix auf SCC <i>in vivo</i>	.29
		4.4.1	Reduktion der Tumorzahl durch 4-MU	29
		4.4.2	Evaluation der HA-Menge	30
4.	5	Einflus	s der HA-Matrix auf SCCZ <i>in vitro</i>	.31

		4.5.1	Verringerung der HA-Menge durch 4-MU	31
		4.5.2	Antiproliferative Wirkung von 4-MU	
		4.5.3	Migrationshemmung durch 4-MU	33
		4.5.4	Proapoptotische Einflüsse von 4-MU	
		4.5.5	Effekte von fragmentierter HA auf SCCZ	35
		4.5.6	Parakriner Einfluss von Keratinozyten	37
5	Disk	ussion	1	39
	5.1	HA un	d am HA-Metabolismus beteiligte Proteine in SCC <i>in vivo</i> .	39
	5.2	HA un	d am HA-Metabolismus beteiligte Proteine in SCCZ in vitro	40
	5.3	Einflus	s der HA-Matrix auf SCC <i>in vivo</i>	42
	5.4	Einflus	s der HA-Matrix auf SCCZ in vitro	43
	5.5	HA als	Faktor für Entstehung und Progression von SCC	45
	5.6	Ausbli	ck	48
6	Litor	aturu	orzoichnic	10
0	LILEI	aturve		49
7	Арр	endix		55
	7.1	Puffer	und Lösungen	55
		7.1.1	Stains-All Stocklösung	55
		7.1.2	Stains-All Arbeitslösung	55
		7.1.3	10x TAE-Puffer	55
		7.1.4	Farbmarkierung für die Lauffront	55
		7.1.5	Elutionspuffer	55
		7.1.6	Quellpuffer	56
		7.1.7	Laufpuffer für die Größenausschlusschromatographie	56
		7.1.8	Pronase-Puffer	56
		7.1.9	PBS	56
		7.1.10	Annexin V Binde-Puffer	56
		7.1.11	TBS/T	56
			Dy Lämmli	57
		7.1.12	2X LdIIIIIII	
		7.1.12 7.1.13	Laufpuffer für SDS-PAGE	

	7.2	Primer	58
8	Kor	ngressbeiträge und Preise	59
	8.1	Kongressbeiträge	59
	8.2	Preise	59
9	Dar	nksagung	60

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
4-MU	4-Methylumbelliferon
ANOVA	Varianzanalyse
АК	aktinische Keratose
АКР	Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
bHABP	biotinyliertes Hyaluronanbindeprotein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CD44	Cluster of Differentiation 44
CFSE	Carbofluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat)
cpm	radioaktive Ereignisse pro Minute
d	Тад
Da	Dalton
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymkonjugierter immunvermittelter Assay
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinthioisocyanat
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GH	gesunde Haut
GlcA	Glukuronsäure
H5	Healon [®] 5
НА	Hyaluronan
HAS	Hyaluronansynthase
HÄM	Hämalaun
HMW	hochmolekular
HYAL	Hyaluronidase
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
ILK	Integrin-linked kinase
К	Kontrolle
kD	Kilodalton
KS	Kontrollhaut
LMW	niedrigmolekular
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung

p-ERK	phosphorylierte extrazellulär regulierte Kinase
рМ	pikomolar
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Reverse-Transkriptase Polymerase-
	Kettenreaktion
Ras	rat sarcoma
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RHAMM	Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility
SCC	Plattenepithelkarzinom (Squamous Cell Carcinoma)
SCCZ	Plattenepithelkarzinomzellen
SDS	Natrium-Dodezylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-Dodezylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBS/T	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween®-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β1	Transforming growth factor 61
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRITON X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]ether
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
UVB	Ultraviolett B
US	Ultraschall
VCPAL	6-O-Palmitoyl-L-Ascorbinsäure
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Humane Epidermis der Felderhaut	. 1
Abb. 2	Struktur von Hyaluronan	.4
Abb. 3	Vereinfachtes Hyaluronansystem in Keratinozyten	. 6
Abb. 4	Bearbeitung von Bildern spezifisch gefärbter Gefrierschnitte mit dem Plug	in
Colour De	convolution des Programmes ImageJ.	19
Abb. 5	Unterschiede der mRNA-Expression von Matrix-assoziierten Genen in	
gesunder	menschlicher Haut und Plattenepithelkarzinomen	22
Abb. 6	Unterschiede der mRNA-Expression von Genen des Hyaluronansystems in	
gesunder	menschlicher Haut und Plattenepithelkarzinomen	23
Abb. 7	Hyaluronanexpression in gesunder Haut, aktinischer Keratose und	
Plattenepi	thelkarzinom	24
Abb. 8	Unterschied des HA-Gehalts im Überstand von Normalen Humanen	
Epidermal	en Keratinozyten und Plattenepithelkarzinomzellen	25
Abb. 9	Unterschiede der mRNA-Menge von hyaluronansynthetisierenden	
und -degr	adierenden Proteinen in NHEK verglichen mit SCCZ	25
Abb. 10	Immunzytochemischer Vergleich von NHEK und SCCZ	26
Abb. 11	Unterschiede der mRNA-Menge von HA-spezifischen Rezeptoren in NHEK	
verglichen	mit SCCZ	27
Abb. 12	Größenausschlusschromatographie de novo synthetisierten Hyaluronans in	n
Überstanc	l von NHEK und SCCZ	28
Abb. 13	4-Methylumbelliferon inhibiert das Wachstum von	
Plattenepi	thelkarzinomen bei Mäusen unter UVB-Bestrahlung	29
Abb. 14	Erhöhter HA-Gehalt in UVB-induzierten Plattenepithelkarzinomen bei	
Mäusen		30
Abb. 15	4-MU reduziert die HA-Sekretion von SCCZ.	31
Abb. 16	Antiproliferative Wirkung von 4-MU auf SCCZ	32
Abb. 17	4-MU wirkt migrationshemmend auf SCCZ	33
Abb. 18	4-MU induziert Apoptose in SCCZ.	34
Abb. 19	Niedrigmolekulare HA-Fragmente wirken proliferativ neutral	35
Abb. 20	HA-Fragmente der Größen 1000 und 150 kD sowie Oktamere sind	
proliferati	v neutral	36
Abb. 21	Hochmolekulares HA und 6-O-Palmitoyl-L-Ascorbinsäure haben keinen	
Effekt auf	die Proliferation <i>in vitro</i>	37
Abb. 22	Protektiver Effekt von niedrigmolekularem HA auf SCCZ	37
Abb. 23	mRNA-Gehalt unterschiedlicher Zytokine in Keratinozyten nach Stimulation	n
mit niedri	gmolekularem HA	38
Abb. 24	Einfluss von HA auf die Entwicklung UV-induzierter SCCs	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Antikörper und Konzentrationen in der Immunzytochemie	14
Tabelle 2	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel der	
Polyacrylami	dgelelektrophorese	16
Tabelle 3	Im Western Blot verwendete Antikörper	17
Tabelle 4	Matrixassoziierte Gene	20

1 Einleitung

1.1 Haut

Die menschliche Haut setzt sich aus drei Schichten zusammen: Epidermis, Dermis und Subkutis [1]. Die zellreiche Epidermis dient als natürliche Barriere und schützt vor Austrocknung, Einflüssen schädlicher Mikroorganismen und ultravioletter (UV) Sonneneinstrahlung. Auftretenden Schädigungen begegnet sie darüber hinaus durch eine kontinuierliche Selbsterneuerung [2]. Diese erfolgt ausgehend von der Basalmembran, die eine Grenze zwischen Dermis und Epidermis bildet, durch Teilung der dort befindlichen Stammzellen der Haut und anschließender Differenzierung zu Keratinozyten. Im Verlauf werden diese durch die von basal nachwachsenden neuen Zellen in Richtung Oberfläche verdrängt, flachen dabei immer weiter ab, verlieren schließlich ihren Zellkern und bilden so das verhornte Plattenepithel der Haut. Dieser Prozess reflektiert sich in den Schichten der Epidermis der Felderhaut, von basal nach apikal: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum [1, 3] (Abb. 1).



Abb. 1 Humane Epidermis der Felderhaut. Einteilung in vier Schichten, immunhistochemische Färbung Hyaluronan (braun) und Hämalaun (blau).

1.2 Plattenepithelkarzinom der Haut

Das Plattenepithelkarzinom der Haut (SCC, engl. squamous cell carcinoma) ist ein maligner Tumor lokal destruktiven Wachstums, der potentiell metastasieren kann. Mit einem Lebenszeitrisiko von 4-14 % ist es der zweithäufigste Krebs der hellhäutigen Bevölkerung, wobei die Inzidenz der Erkrankung in den letzten Jahrzenten stark angestiegen ist. Liegt bei Erstdiagnose ein lokal begrenztes SCC vor, ist die Prognose sehr gut, Metastasen kommen vergleichsweise selten vor. Im Falle der Metastasierung sinkt die 10-Jahres-Überlebensrate allerdings auf 10-20 %. Aufgrund seines insgesamt häufigen Auftretens ist das SCC daher dennoch für einen Großteil der tödlich verlaufenden, nicht durch maligne Melanome bedingten, Hautkrebsfälle verantwortlich. Prädominanter Risikofaktor für die Entstehung von SCCs ist chronische UVB-Exposition (290-320 nm Wellenlänge), womit Prädilektionsstellen für das Auftreten von SCCs sonnenlichtexponierte Hautareale sind [4]. Einen Schritt in der multifaktoriellen Genese von Tumoren stellt die Entstehung von DNA-Mutationen in Keratinozyten durch UVB-Exposition der Haut dar. Die so entstehenden Veränderungen im Genom sind vorwiegend C \rightarrow T Basenwechsel oder CC \rightarrow TT Doppelbasenwechsel, wobei letztere als spezifisches Erkennungsmerkmal UV-induzierter Schädigungen gelten. Im überwiegenden Teil der SCCs führen diese Mutationen zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 [5], welches durch Zellzyklusarrest oder Einleitung der Apoptose präkanzeröse Zellen an der Teilung hindern kann [6, 7]. Mutationen in p53 wurden auch in der aktinischen Keratose (AK) detektiert, welche sich häufig in benachbarten Regionen eines SCC findet und diesem als Prämalignität vorausgehen kann [8]. Auf diese Weise vorgeschädigte Zellen können ungehindert proliferieren und unter erneuter UV-Exposition weitere Mutationen akkumulieren, während umgebende gesunde Zellen bei Strahlungsschädigung absterben [9]. Durch die klonale Expansion der mutierten Zelle steigt die Zellzahl und damit die Wahrscheinlichkeit für weitere Alterationen des Genoms stark an, sodass im Verlauf ein maligner Tumor entstehen kann [10, 11]. Neben der p53-Inaktivierung scheinen noch weitere Faktoren zur Entartung von Keratinozyten beizutragen, wie etwa eine Deregulierung des Zellzyklus und die Aktivierung von Angiogenese [12, 13]. Des Weiteren wurde in SCCs im Vergleich gesunder Haut und AK eine verstärkte Aktivierung bestimmter zu Phosphorylierungskaskaden nachgewiesen, Ras-Raf-ERKdarunter auch der

Signalweg [14]. Dieser wird ebenfalls durch UV-Strahlung beeinflusst und spielt eine wichtige Rolle bei Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose [15]. Aus den genannten Aspekten ergibt sich ein, sicherlich unvollständiges, Bild des vielschichtigen Prozesses der Genese und Proliferation von UV-induzierten SCCs. Die Progression des entstandenen Tumors gilt es weiterhin im Kontext seiner extrazellulären Umgebung zu betrachten.

1.3 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) umgibt die Zellen eines Gewebes, erhält die strukturelle Stabilität des Gewebes und schafft ein Milieu, das reziproken Einfluss auf viele basale Zellfunktionen nimmt [16]. Die verschiedenen Bestandteile der EZM lassen sich in Proteoglykane, Glykoproteine und fibrilläre Komponenten, welche in Form von Kollagen mengenmäßig den Hauptteil stellen, einteilen. Im Zuge der unterschiedlichen und ständig wechselnden Anforderungen an das Zell-Matrix-Gefüge unterliegt es einer Dynamik kontinuierlicher Degradation, Synthese und Remodellierung [17]. Diese Umformungsfähigkeit ist auch bei Interaktionen zwischen Matrix und Zellen von Bedeutung. Je nach Größe der Moleküle können Rezeptoren an der Zelloberfläche für Liganden zur Bindung freigegeben oder verdeckt werden, was zu verschiedenen, teilweise konträren Wirkungen führen kann [18]. Weiterhin dienen manche EZM-Bestandteile als eine Art Reservoir für Wachstumsfaktoren, welche dann, durch dessen Abbau, kontinuierlich freigegeben werden können [16]. Neben diesen eher passiven Vorgängen spielt die EZM eine entscheidende Rolle bei der Regulation zellulärer Mechanismen durch die Aktivierung und Inaktivierung zellulärer Rezeptoren, wie im Fall der für Hyaluronan (HA) spezifischen Rezeptoren CD44 [19] und RHAMM (Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility) [20]. Über die Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden kann so das Verhalten von Zellen gesteuert werden [21, 22], beispielsweise Zellzyklus [23] und Motilität [21]. Im menschlichen Gewebe wird CD44 von vielen Zellarten exprimiert, darunter Fibroblasten [24], Endothelzellen [25] und epitheliale Zellen wie Keratinozyten [26]. Eine hohe RHAMM-Expression findet sich oft in malignen Phänotypen von Zellen epithelialer Abstammung, zum Beispiel dem Ösophagus- [27] oder dem Urothelkarzinom [28], welche auch eine erhöhte Menge von den an der EZM-Synthese beteiligten Proteinen aufweisen [29, 30]. Die für die

Gewebshomöostase unerlässlichen und besonderen Eigenschaften qualifizieren Bestandteile der EZM und Rezeptoren, die mit der EZM interagieren, als einflussreiche Faktoren bei der Ausbreitung von Tumoren.

1.4 Hyaluronan

1.4.1 Struktur

Hyaluronan (Hyaluronsäure, HA) ist ein Polysaccharid aus der Gruppe der Glykosaminoglykane. Es besteht aus Glukuronsäure und N-Azetylglukosamin, die in Form von Disacchariden zu einem negativ geladenen, unverzweigten Strang verknüpft sind (Abb. 2). Die Länge dieses Strangs kann vom Tetrasaccharid bis zum Polymer aus mehr als 25.000 Einheiten reichen, was einem Molekulargewicht von 2x10⁶- 1x10⁷ Da entspricht [18, 31].



Abb. 2 Struktur von Hyaluronan. HA besteht aus sich wiederholenden [- β (1, 4) –Glukuronsäure - β (1, 3) –N-Acetylglukosamin-]_n Einheiten. Abgebildet sind zwei Disaccharideinheiten. Erstellt nach Jiang et al. [32].

1.4.2 Metabolismus

Im Unterschied zu anderen Glykosaminoglykanen wird HA nicht im Golgi-Apparat gebildet, sondern durch membranständige Hyaluronansynthasen (HAS) direkt in den Extrazellulärraum abgegeben. Im Menschen existieren die drei HAS-Isoformen 1, 2 und 3, letztere durch alternatives Spleißen als HAS3a und b [33, 34]. Bei der HA-Synthese werden zunächst N-Acetylglukosamin und Glukuronsäure (GlcA) durch eine UDP-Glukuryltransferase mit Uridindiphosphat (UDP) aktiviert. Durch die Verknüpfung dieser beiden Grundbausteine synthetisiert HAS1 HA-Stränge im Bereich von 2x10⁵ bis 2x10⁶ Da, HAS2 mehr als 2x10⁶ Da große Stränge und HAS3 Stränge von 1x10⁵ bis

1x10⁶ Da [35, 36]. So entstandenes HA unterliegt einer enzymatischen Spaltung durch Hyaluronidasen (HYAL), von denen sechs Varianten im menschlichen Genom detektiert wurden [37]. Von diesen tragen HYAL1 und 2 den Hauptteil zur Degradation von HA in somatischen Geweben bei [38]. HYAL1 ist intra- und extrazellulär vorhanden. Innerhalb der Zelle befindet sie sich wahrscheinlich in Lysosomen, extrazellulär ist sie gelöst im Plasma detektierbar [39, 40]. Weiterhin kann sie aus dem Plasma in Zellen aufgenommen werden, sodass selbst ohne eigene Synthese HYAL1 intrazellulär nachgewiesen werden kann [41]. HYAL1 spaltet HA jeder Größe zu kleinen Oligomeren, vornehmlich zu Tetrasachariden [38, 42]. Den im Zellinneren ablaufenden katabolen Prozessen wird HA aus der EZM vermutlich durch Endozytose zugeführt [43-45]. HYAL2 agiert extrazellulär im Bereich der Zelloberfläche in Interaktion mit CD44 [42, 46]. Sie ist in der Lage, hochmolekulares HA zu Spaltprodukten von etwa 2,0x10⁴ Da abzubauen [47]. Die kleinsten Spaltprodukte der HYALs können von lysosomalen Enzymen weiter zersetzt werden, sodass sie als Monosacharide wieder anderen Stoffwechselkreisläufen zur Verfügung stehen. Täglich wird etwa ein Drittel des gesamten im Körper enthaltenen HA auf diese Weise metabolisiert (Abb. 3) [48, 49].

1.4.3 Physiologie und Pathophysiologie

Verglichen mit seiner einfach scheinenden Struktur hat HA sehr komplexe und vielfältige physiologische Eigenschaften. Unter genauerer Betrachtung können verschiedenen Größenvarianten des im Körper vorhandenen HA-Systems spezifische Wirkungen zugeordnet werden. Hochmolekulares HA besitzt beispielsweise anti-angiogene [50, 51], anti-inflammatorische und immunsuppressive Effekte [52, 53]. Anhand der epidermalen Keratinozytendiffenzierung konnte gezeigt werden, dass es auch in der Lage ist, die Zellentwicklung zu unterdrücken [54]. HA-Fragmente im niedrigmolekularen Bereich von etwa 200 bis 250 kD zeigen hingegen eine pro-inflammatorische [55-58] und HA-Oligomere eine pro-angiogene [59, 60] sowie pro-proliferative [61] und migrationsfördernde Wirkung [62, 63]. Von kleinsten HA-Fragmenten im Bereich von Tetrasacchariden ist bekannt, dass sie Apoptose supprimieren [64].

Auch in der Pathophysiologie von Neoplasien ist HA ein entscheidender Faktor. So wurde in bestimmten Fällen eine Korrelation zwischen dem Grad der HA-Produktion und der Tumormalignität nachgewiesen und in einigen Karzinomen ist ein hoher HA-Gehalt ein prognostischer Faktor für die Morbidität des Patienten. HA als EZM-Bestandteil kann

dabei genau mittels der oben vorgestellten Charakteristiken zur Steuerung des Verhaltens von Tumorzellen beitragen: Es beeinflusst die Biomechanik der Zelle, bildet eine repetitive Formvorlage für Interaktionen mit anderen perizellulären Makromolekülen und interagiert selbst mit Zellrezeptoren [65]. Dies zeigt sich beispielsweise bei Metastasen kolorektaler Karzinome, deren HAS3-Expression und perizelluläre HA-Sekretion relativ zum Primärtumor erhöht ist [66]. Im Fall hochdifferenzierter SCCs wurde eine hohe Expression von HA und dem HA-Rezeptor CD44 nachgewiesen [67], während sich HA in niedrigdifferenzierten epithelialen Tumoren in geringerer Quantität und nach verändertem Muster darstellte, was mit einer schlechteren Überlebensrate einherging [68]. Die besondere Relevanz von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen in der Pathogenese solider Tumoren ermöglicht neue Ansätze zur Krebstherapie, in denen HA und HA-Metabolismus das Ziel pharmakologischer Interventionen werden könnten [69].





1.5 4-Methylumbelliferon

Eine mögliche pharmakologische Interventionsstrategie besteht darin, die HA-Synthese zu hemmen. Der Hyaluronansyntheseinhibitor 4-Methylumbelliferon (4-MU) ist von seinem Grundgerüst her ein Derivat der Cumarine. Durch die Hydroxylierung an Position 7 ist es den Umbelliferonen zugehörig, als weitere Spezifikation weist es die namensgebende Methylierung an Position 4 auf. 4-MU hemmt den Prozess der HA-Synthese kompetitiv und selektiv, indem es als falsches Substrat an Stelle von UDP durch die UDP-Glukuryltransferase mit GlcA verbunden wird. Hierdurch kommt es zu einem Mangel der für den Bau des HA-Strangs essentiellen UDP-GlcA, woraus eine verringerte HA-Menge unter 4-MU-Behandlung resultiert [70, 71]. Diese Modulation der EZM hat direkten Einfluss auf das Zellverhalten. So konnte etwa gezeigt werden, dass 4-MU die Aktivierung und Hyperproliferation von Keratinozyten unter Stimulation mit Epidermal Growth Factor verhindert [72]. Weiterhin scheint es die Adhäsion und Lokomotion sowie Metastasenbildung des malignen Melanoms in der Leber zu verringern [73, 74]. Auch bei Brustkrebszellen besitzt es das Potential, Tumorwachstum und Metastasierung in den Knochen zu unterdrücken [75]. Aktuell wird 4-MU unter dem Namen Hymecromon zur Behandlung von Gallenkoliken klinisch angewendet.

2 Ziele der Arbeit

Chronische Exposition gegenüber UV-Licht kann beim Menschen zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Haut beitragen. Steigende Inzidenzen über die letzten Jahrzehnte unterstreichen die Notwendigkeit neuer Ansätze in der Behandlung. Einen wichtigen pathogenen Faktor bei der Tumorgenese scheinen Veränderungen in Struktur und Zusammensetzung der epidermalen EZM darzustellen. Eine Hauptkomponente dieser Matrix ist HA, welches durch drei membranständige Isoenzyme der HAS in den Extrazellulärraum abgegeben und katabol durch HYAL1-2 zu Fragmenten geringeren Molekulargewichts degradiert wird. HA und insbesondere die biologisch aktiven HA-Fragmente werden mit tumorfördernden Prozessen wie Migration, Proliferation und Angiogense in Verbindung gebracht.

Ziel der Arbeit ist daher, Einflüsse der HA-Matrix auf SCC *in vivo* und SCCZ *in vitro* zu untersuchen. Dazu wurden humane SCCs der Haut auf ihren Gehalt an HA und von am HA-Metabolismus beteiligten Proteinen hin analysiert sowie Einflüsse von veränderter HA-Matrix auf die UV-induzierte SCC-Genese im Mausmodel untersucht. Ein weiterer Fokus wurde auf die Effekte von HA auf Keratinozyten und SCC-Zellen in Kultur sowie deren Expression von den an der HA-Synthese- und -Degradation beteiligten Proteinen gelegt. Schließlich wurden anhand mechanistischer Untersuchungen die Wirkungen einer veränderten HA-Matrix auf funktionelle Parameter von Tumorzellen wie Proliferation, Migration und Apoptose analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Es wurden humane epidermale Plattenepithelkarzinomzellen einer weiblichen Spenderin (SCC, A431, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, United Kingdom) [76] und normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK, PromoCell, Heidelberg) verwendet. Erstgenannte wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma, Steinheim), versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum (FCS, Pan Biotech, Aidenbach) und zwei Antibiotika (100 I.E./ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin-G, Invitrogen, Karlsruhe), in Kultur gehalten. Bei den NHEKs wurde Keratinocyte Growth Medium 2 (PromoCell, Heidelberg), unter Zugabe von 0,06 mM CaCl₂, Supplement Mix (PromoCell, Heidelberg) und den oben genannten Antibiotika verwendet. Generell wurden die Zellen subkonfluent, einschichtig bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre kultiviert. Zur Passagierung wurde einmal mit Phosphat Buffered Saline (PBS, Dako, Hamburg) gewaschen, die Ablösung von der Kulturschale erfolgte durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin). Die Trypsinierung wurde bei den SCCs nach 10 min durch Zugabe einer äquivalenten Menge DMEM mit 10 % FCS abgestoppt und die Zellsuspension bei 1.100 rpm für 5 min zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in frischem Medium resuspendiert und die Gesamtzellzahl, Zahl lebender Zellen und Viabilität mithilfe eines automatisierten Zellzählers (Countess, Invitrogen, Carlsbad, USA) bestimmt. Die Versuche mit SCC-Zellen erfolgten zwischen Passage 13 und 25 und, sofern nicht anders angegeben, bei einer Dichte von 50.000 Zellen pro Kammer einer 6-Loch-Kulturplatte mit DMEM als Kulturmedium und 24 h dauernder Synchronisation vor Zugabe der Stimuli. Zur Untersuchung der Effekte von 4-Methylumbelliferon (Sigma, Steinheim) wurde dieses als Natriumsalz in einer Konzentration von 100 µM gelöst in ddH2O verwendet. Für Untersuchungen an NHEK wurden Zellen bei einer Dichte von 50.000 pro Kammer zwischen Passage 3 und 4 ausgesät, als Medium zur Synchronisation diente das Keratinocyte Growth Medium 2 ohne Supplement Mix.

3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinmenge der pro Versuch verwendeten Zellen wurde mittels eines Bradford-Tests gemessen. 200 µl des 1:5 mit ddH₂O verdünnten Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München) wurden in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Nach Erstellung einer BSA-Eichreihe als Standard und Zugabe der Proben wurde die Extinktion bei 596 nm photometrisch mithilfe eines *Microplate Readers* (Bio-Rad, München) bestimmt.

3.3 Bestimmung der HA-Menge

Die Menge der HA im Überstand der Zellkultur wurde durch den Hyaluronic Acid Test Kit (Corgenix, Colorado, USA) den Herstellerangaben entsprechend bestimmt. Dabei wurden HA-Proben und HA-Referenzlösungen auf eine 96-Loch-Platte gegeben, deren Kammern mit HA-bindendem Protein (HAbP) beschichtet waren. Nach einstündiger Inkubation erfolgte eine vierfache PBS-Waschung. Danach wurden 100 µl Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes HAbP hinzugegeben und erneut viermal mit PBS gewaschen. Die Farbreaktion wurde mit Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin als Substrat gestartet und nach 30 min mit 100 µl Stopplösung beendet. Die Extinktionsmessung erfolgte mittels eines Microplate Readers (Bio-Rad, München) bei 450 nm. Die freigesetzte HA-Menge wurde als Verhältnis der HA-Konzentration zur Gesamtproteinkonzentration des Zellrasens angegeben.

3.4 HA-Größenausschlusschromatographie

NHEK und SCC-Zellen wurden wie unter 3.1 beschrieben jeweils in einer 6-Loch-Platte kultiviert und nach der Synchronisation für 24 h mit 40 μCi/ml [³H]-Glukosamin (Perkin Elmer, Rodgau) inkubiert, um *de novo* synthetisiertes HA nachweisen zu können. Der abgenommene Überstand wurde daraufhin mit 500 μg/ml Pronase (Sigma, Steinheim) 12 h bei 37 °C verdaut, damit proteinvermittelte Bindungen zwischen den HA-Strängen gelöst werden. Dann wurde die Reaktion durch fünfzehnminütige Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 95 °C gestoppt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung des gesamten Überstandes über eine Sephadex-G50-Säule. Der Durchfluss, der das nicht gebundene [³H]-Glukosamin enthielt, wurde verworfen. Das verwendete Säulenmaterial wurde zuvor durch mehrfaches Aufkochen in Quell-Puffer (siehe Appendix) equilibriert. Die hochmolekulare Glukosaminoglykanfraktion wurde mit 1,5 ml Elutionspuffer eluiert.

Nach Aufnahme in Szintillationsflüssigkeit wurde mithilfe eines LS6000IC Szintillationszählers (Beckman Coulter, Krefeld) ein Aliquot abgemessen, das 20.000 cpm enthielt, und auf eine Sephacryl-S-1000-Säule (GE-Healthcare, München) gegeben. Unter kontinuierlicher Zugabe von Laufpuffer (siehe Appendix) wurde die HA auf diese Weise der Größe nach chromatographisch getrennt und mit einem Fraktionssammler Fraktionen über je 2,5 min aufgenommen. Aus den gesammelten 65 Fraktionen konnte über die Messung der cpm ein Fraktionsnummernverlauf generiert werden, der die Unterschiede in der durch die beiden Zellarten produzierten HA-Größe abbildet. Für die Durchführung dieser Methode bedanke ich mich bei Dr. Katharina Gorges.

3.5 Herstellung von HA-Fragmenten durch Ultraschall-Bestrahlung

Zur Herstellung von HA-Fragmenten wurde als Ausgangssubstanz das hochmolekulare HA Healon5[®] (Abott Medical Optics Inc., Ettlingen) verwendet. 100 μ g HA in einer Konzentration von 10 μ g/ μ l wurden in einem Ultraschall-Bad (SONOREX SUPER, Bandelin, Berlin) für eine Dauer von 10 h mit einer Frequenz von 35 kHz beschallt [56, 77]. Anschließend wurde die Degradation mittels Gelelektrophorese verifiziert.

3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurde ein 5 mm dickes Gel mit 0,5 % Agarose in Tris-Azetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gegossen. Taschen wurden durch Einlage eines Kamms mit 2 mm starken Zinken erzeugt. Die HA-Proben wurden mit PBS auf eine Konzentration von 1 μg/μl verdünnt. Daraufhin wurde eine Gesamtmenge von 15 μg HA zusammen mit 2 μl Farbmarkierung für die Lauffront (siehe Appendix) pro Tasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte für 4 h bei 100 mA und einer Spannung von 80 mV. Im Anschluss wurde das Gel im Dunkeln mit einer Arbeitslösung (siehe Appendix) des Farbstoffs *Stains-All* (Sigma, Steinheim) über Nacht gefärbt. Entfärbt wurde durch einstündige Lichtexposition in ddH₂O [78].

3.7 Migrationsmessung mit einer modifizierten Boyden-Kammer

Zur Quantifizierung der migratorischen Aktivität wurde eine modifizierte Boyden-Kammer benutzt. Diese besteht aus einer oberen Platte mit in Sechsergruppen angeordneten Kammern, die durch eine mit monomerem Kollagen (Nutacon BV, Leimuiden, Niederlande) beschichteten Polycarbonat-Membran (Neuroprobe, Cabin John, USA) mit 10 µm messenden Poren von einer unteren Platte mit deckungsgleichen Kammern getrennt wird. In den unteren Gruppen befand sich Medium, in die oberen Gruppen wurden SCC-Zellen in DMEM mit einer Dichte von 16.000 Zellen pro Kammer unter Addition der jeweiligen Stimuli gegeben. Nach sechsstündiger Inkubation wurden die nicht gewanderten Zellen von der Membranoberseite entfernt und die auf die Unterseite migrierten Zellen mit Methanol (Merck, Darmstadt) fixiert. Es folgte eine Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (Sigma, Steinheim) mit anschließender Detektion bei 700 nm durch ein nah-Infrarot Fluoreszenzbildgebungssystem (Odyssey[®], Li-Cor, Bad-Homburg). Die quantitative Auswertung erfolgte anhand einer Intensitätsmessung der gefärbten Zellen, hierzu wurden die Intensitäten der Sechsergruppen jeweils gemittelt.

3.8 Proliferationsmessung durch [³H]-Thymidininkorporation

Die Proliferationsrate der SCC-Zellen wurde durch die Inkorporation von [³H]-Thymidin (Perkin Elmer, Bodgau-Jügesheim) bestimmt. Nach Aussaat von 20.000 Zellen pro Kammer einer 12-Kammer-Platte erfolgten je eine 24-stündige Anwachs-, Synchronisations- und Stimulationsphase. Für die letzten 6 h der Stimulation wurde mit 1 µCi/ml [³H]-Thymidin inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen zweimal mit 500 µl kaltem PBS gewaschen, die Inkorporation durch zweiminütiges Behandeln mit 500 µl 0,1 M Perchlorsäure abgestoppt und schließlich der Zellrasen mit 300 µl 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung lysiert. Der Proteinanteil des Lysats wurde wie unter 3.2 beschrieben ermittelt. Es folgte eine Bestimmung der Menge des eingebauten [³H]-Thymidins als *counts per minute* durch einen Szintillationszähler (LS6000IC, Beckman Coulter, Krefeld), welche dann auf die Proteinmenge normalisiert wurden.

3.9 Durchflusszytometrie

3.9.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer ermöglicht eine Analyse der Eigenschaften von Zellen, indem es deren Streuung von Licht in zwei Dimensionen, vorwärts und seitwärts, vermisst. Dazu werden die Zellen im Fluss einer Kapillare an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die Vorwärtsstreuung des Lichts lässt Rückschlüsse auf die Zellgröße zu, die seitliche Streuung auf die intrinsische Beschaffenheit der Zelle. Über diese Parameter kann eine Charakterisierung unterschiedlicher Populationen erfolgen. Die Verwendung von Fluoreszenz-Antikörpern erweitert das Anwendungsgebiet auf die Detektion spezifischer Oberflächenmerkmale. Für die Durchführung der Messungen am Durchflusszytometer sei Prof. Dr. Maria Grandoch und Dr. Kathrin Feldmann gedankt.

3.9.2 Proliferationsmessung

Als weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Proliferationsrate, auch als Evaluation eines Ansatzes ohne Radioaktivität, wurde die Messung der Emission von Carbofluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester (Cell Trace[™] CFSE Cell Proliferation Kit, Molecular Probes[™], Life Technologies™, Eugene, USA) im Durchflusszytometer (Gallios™, Beckman Coulter, Krefeld und guava[®] easyCyte[™], Milipore, Billerica, USA) genutzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet kovalent an intrazelluläre Makromoleküle und wird bei der Zytokinese gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt [79]. Die Markierung mit CFSE wurde in modifizierter Form nach der von Lyons und Parish für Lymphozyten etablierten Methode [80, 81] durchgeführt. Dabei wurden die Zellen nach dem Trypsinieren und anschließendem Zentrifugieren in PBS resuspendiert und daraufhin in einer Konzentration von 500.000 Zellen pro ml in einem 50 ml Falcon-Röhrchen aufgenommen. Unter Ausschluss direkter Lichteinstrahlung erfolgte eine Färbung mit einer Endkonzentration von 1 μ M CFSE. Die Färbung wurde nach 5 min durch Zugabe von 5 ml DMEM mit 10 % FCS abgestoppt. Es folgte als Waschschritt dreimaliges Abzentrifugieren mit Resuspension in je 5 ml DMEM mit 10 % FCS. Schließlich wurden die Zellen mit einer Konzentration von 50.000 Zellen pro Kammer in eine 6-Loch-Kulturplatte ausgesät und für 24 h kultiviert. Nach weiteren 24 h Synchronisation erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit den zu untersuchenden Stoffen. Daraufhin wurden die Zellen trypsiniert und in 1,5 ml Falcon-Röhrchen mit 500 µl DMEM resuspendiert. In der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte die Exzitation bei 488 nm Wellenlänge. Die mittlere Emission im grünen Kanal (525 nm) wurde reziprok ausgewertet als Maß für die Proliferationsrate angesehen.

3.9.3 Apoptose

Zur Evaluation der Apoptoserate wurde die Methode der Phosphatidylserindetektion mittels fluoreszenzmarkiertem Annexin V nach Vermes *et al.* [82] verwendet. Phosphatidylserine werden unter apoptotischen Bedingungen von der Innen- auf die

Außenseite der Zellmembran verbracht, wo Annexin V mit hoher Affinität bindet. Die Zellen wurden wie unter 3.1 beschrieben ausgesät, kultiviert und stimuliert. Auf die Trypsinierung und anschließende Zentrifugierung folgte eine Resuspendierung mit 25 μ l Annexin-V-Bindepuffer (siehe Appendix). Das mit Alexa Fluor® 488 markierte Annexin V (Annexin V, Alexa Fluor® 488, Invitrogen, Karlsruhe) wurde in einer Konzentration von 1:25 verwendet, die Inkubation erfolgte lichtgeschützt für 15 min bei Raumtemperatur. Nach Addition weiterer 500 μ l Annexin-V-Bindepuffer fand die Messung im Durchflusszytometer bei 525 nm statt. Die mittlere Fluoreszenzintensität bei dieser Wellenlänge wurde als Maß für die Apoptoserate angesehen, als Positivkontrolle wurde Staurosporin in einer Konzentration von 2 μ M verwendet.

3.10 Immunzytochemie

SCC-Zellen und NHEKs wurden bei einer Dichte von 25.000 Zellen pro Kammer einer 12-Loch-Kulturplatte auf 16 mm Deckgläser ausgesät und wie unter 3.1 beschrieben kultiviert und stimuliert. Daran anschließend wurde mit PBS gewaschen und 20 min mit 3,5 % Formalin fixiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 0,3 % TRITON X-100[®] (Sigma, Steinheim) permeabilisiert, in der Folge dreimal mit PBS gewaschen und danach 1 h in 3 % Bovinem Serum Albumin (BSA, Sigma, Steinheim) in PBS blockiert. Dann wurde mit dem 1. Antikörper (AKP), gelöst in PBS mit 1 % BSA, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneut dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die 2. AKP-Färbung, lichtgeschützt bei Raumtemperatur, wiederum für 1 h in PBS mit 1 % BSA. Die AKPs wurden gemäß Tabelle 1 verdünnt. Schließlich wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS in ProLong® Gold (Invitrogen, Karslruhe), einem 4',6-Diamidin-2phenylindol(DAPI)-haltigen Medium, eingedeckt. Die angefärbten Epitope wurden mit dem Zeiss Axio Observer.Z1 Mikroskop mit dem ApoTome.2 Modul und der AxioVision Software Version 4.8.20 (alles Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) dargestellt.

Tabelle 1 Verwendete Antikörper und Konzentrationen in der Immunzytochemie

1. Antikörper	Hersteller	Verdünnung
HAS3, Hase IgG	Santa Cruz, Heidelberg	1: 250
HYAL1, Hase IgG	Abcam, Cambridge, USA	1: 250
HYAL2, Hase IgG	Abcam, Cambridge, USA	1: 250
2. Antikörper	Hersteller	Verdünnung
CY3, Anti-Hase, Maus IgG	Sigma, Steinheim	1: 1000

3.11 Gesamt RNA-Isolation und Messung der mRNA-Konzentration

Die zu lysierenden Zellen wurden mit 1 ml TriReagent[®] (Sigma-Aldrich, München) 10 min lang bei 22 °C inkubiert. Die Aufarbeitung gemäß den Angaben des Herstellers umfasste die Ausschüttelung der wässrigen, RNA-haltigen Phase des TriReagents gegen Chloroform, eine Fällung mit Isopropanol und eine anschließende Waschung mit Ethanol. Nach Lufttrocknung bei 22 °C und darauffolgender Resuspension in 20 µl RNAse-freiem ddH₂O wurde die RNA-Konzentration mithilfe eines Nanodrop 1000 (PeqLab, Erlangen) bei 260 nm photometrisch bestimmt.

3.12 cDNA-Synthese und *realtime* RT quantitative PCR (qRT-PCR)

3.12.1 cDNA-Synthese

Zum Umschreiben in komplementäre DNA (cDNA) wurde 1 μ g der, wie oben beschrieben, isolierten RNA, gelöst in RNAse-freiem ddH₂O, verwendet. Die benötigten Reagenzien stammten aus dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Quiagen, Hilden). Das Protokoll nach Herstellerangaben beinhaltete die Entfernung genomischer DNA mittels Addition von 2 μ l DNA-*wipe-out* Puffer für zwei min bei 42 °C, anschließende Zugabe eines *Master Mix* aus 4 μ l Reverse Transkriptase (RT)-Puffer, 1 μ l RT-Enzym und 1 μ l Primer mit folgender Inkubation in einem *Cycler* (Mastercycler gradient S, Eppendorf, Hamburg) für 30 min und eine dreiminütige Erhitzung auf 92 °C zur Enzyminaktivierung. Daraufhin wurde die generierte cDNA in 100 μ l ddH₂O bei 4 °C gelagert.

3.12.2 *Realtime* RT quantitative PCR

Die *realtime* RT quantitative PCR (qRT-PCR) wurde mithilfe des ABI *real time* System (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung des *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Karlsruhe) auf einer Opticon 1 Platte (MJ-Research, Waltham, USA) den Herstellerangaben gemäß durchgeführt. Jeder Ansatz zur Quantifizierung der mRNA eines Gens enthielt 10 µl Reaktionsmix, 5 µl cDNA und 2,5 µl jeden Primers, entsprechend einer Endkonzentration von 10 pM *forward* und *reverse* Primer. Als endogene Kontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) unter identischen Bedingungen. Die verwendeten Primer-Sequenzen (Appendix) wurden mit der Software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/)

entworfen. Das Temperaturprofil der PCR-Zyklen entsprach dem folgenden Schema: 50 °C für 2 min, 95 °C für 2 min zur Denaturierung, 40 Zyklen mit 95 °C für 15 sec und 60 °C für 30 sec zur Anlagerung und Elongation. Als Qualitätskontrolle erfolgte nach Abschluss der PCR eine Schmelzkurvenanalyse. Die Genexpression wurde mit der $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ -Methode für jede Probe relativ zur GAPDH berechnet. Die Durchführung der *realtime* RT quantitativen PCR übernahm freundlicherweise Dr. Katharina Gorges.

3.13 SDS-PAGE und Western Blot

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 2x Lämmli-Puffer (Appendix) lysiert und die Proteine daraufhin bei 95 °C 10 min lang denaturiert. Die Auftrennung des Protein-Lysats erfolgte durch eine diskontinuierliche Natriumdodzylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Tabelle 2) bei einer Geldicke von 1,5 mm. Die Spuren des Gels wurden mit je 30 µl Probe beladen, als Größenstandard dienten 5 µl eines Molekulargewichtsmarkers (PageRuler™ *Prestained Protein Ladder*, Fermentas, St.Leon-Roth, USA). Die angelegte Spannung betrug 140 V. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman[®], Sigma, Steinheim) erfolgte mittels *Semi-Dry*-Blot über 1 h bei 12 V.

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid 40 %	3,3 ml	1,0 ml
dH₂O	4,40 ml	4,1 ml
1,5 M Tris Base pH 8,8	2,5 ml	-
1,0 M Tris Base pH 6,8	_	0,75 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,06 ml
10 % APS	0,1 ml	0,06 ml
TEMED	0,004 ml	0,006 ml

 Tabelle 2
 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel der Polyacrylamidgelelektrophorese

Anschließend wurden für 1 h unspezifische Bindungsstellen der Membran mit 5 % BSA in Tris gepufferter Salzlösung mit Tween[®] 20 (*Tris-Bufferd-Saline*, TBS/T) blockiert. Die Inkubation mit dem 1. AKP erfolgte über Nacht bei 4 °C, mit dem 2. AKP über 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur. Dabei wurden die AKP gemäß Tabelle 3 in 3 % BSA in TBS/T verdünnt und die Membran nach jeder Inkubation dreimal je 5 min in frischem TBS/T gewaschen. Anschließend wurden die Proteinbanden mit dem oben beschriebenen Odyssey-System detektiert. Zur Ladungskontrolle wurde auf die Bande des konstitutiv exprimierten Proteins β-Tubulin normiert.

1. Antikörper	Hersteller	Verdünnung
ERK 1/2, Hase IgG	Cell Signaling Techn., Danvers, USA	1:1000
P-ERK 1/2, Hase IgG	Cell Signaling Techn., Danvers, USA	1:1000
PARP, Hase IgG	Cell Signaling Techn., Danvers, USA	1:1000
β-Tubulin, Maus IgG	Sigma, Steinheim	1:10000
2. Antikörper	Hersteller	Verdünnung
IRDye 800 Anti-Hase, Ziege	Li-Cor, Lincoln, USA	1:5000
IRDye 680 Anti-Maus, Ziege	Li-Cor, Lincoln, USA	1:5000

Tabelle 3 Im Western Blot verwendete Antikörper

3.14 Mausmodel zum Einfluss von UV-Strahlung auf die Genese von SCC

Als *in vivo* Model für den Einfluss von UV-Strahlung auf die Genese der SCCs wurden weibliche SKH-1-Nacktmäuse im Alter von acht Wochen verwendet (Genehmigt unter AZ 8.87-50.10.34.08.022). Sie wurden in vier Gruppen unterschiedlicher Behandlungsart eingeteilt. Die Modalitäten bildeten mit dem HA-Inhibitor 4-MU versetzte Nahrung mit Schokoladenaroma, UV-Bestrahlung, keine UV-Bestrahlung sowie Nahrung ohne 4-MU-Versatz mit Schokoladenaroma. Die entsprechende Gruppenbildung lautete: 4-MU-Nahrung mit Bestrahlung, 4-MU-Nahrung ohne Bestrahlung, Bestrahlung ohne 4-MU-Nahrung und als Kontrolle Nahrung mit Schokoladenaroma ohne Bestrahlung. Die Bestrahlung der Mäuse mit UV-Licht einer Stärke von 80 mj/cm² erfolgte dabei dreimal wöchentlich über eine Dauer von 20 Wochen, die Konzentration von 4-MU im Futter betrug 10 mg/d. Im Alter von 29 Wochen wurden den Mäusen die verwendeten Biopsien der Haut entnommen. Für die Planung und Durchführung dieses Versuchs sowie die Überlassung der Biopsien möchte ich mich bei Dr. Katharina Gorges bedanken.

3.15 Immunhistochemie

3.15.1 Humane Hautproben

Die Paraffinschnitte der humanen Proben von gesunder Haut und Plattenepithelkarzinomen wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Homey aus der Hautklinik der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt (Studiennummer 1928).

3.15.2 Murine Hautproben

Proben von Haut und Tumorgewebe wurden nativ entnommen und gewebeschonend in TissueTek®-Einbettmedium (Leica Microsystems, Wetzlar) bei -40 °C eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C, die Verarbeitung am Kryostaten (CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar) bei -20 °C. Die Schnittdicke betrug 14 µm, fixiert wurde mit 4 °C kaltem Ethanol für 20 min. Vor der weiteren Prozessierung wurden die Kryoschnitte jeweils mit PBS gewaschen. Für die Verarbeitung der murinen Proben und die Überlassung der daraus gefertigten Schnitte darf ich mich bei Dr. Katharina Gorges bedanken.

3.15.3 Hyaluronanspezifische Färbung

Zur HA-spezifischen Färbung der humanen und murinen Schnitte wurde in einer feuchten Kammer zuerst 10 min mit Avidin (Thermo Scientific, Oberhausen) blockiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und danach 5 min in PBS gewaschen. Als zweites folgte 10 min Blockade durch Biotin (Thermo Scientific, Oberhausen) mit fünfminütigem PBS-Waschschritt. Daraufhin wurde 1 h bei Raumtemperatur mit 10 % FCS und 1 % BSA in PBS blockiert und anschließend mit HA-Bindeprotein (HABP, Calbiochem, Darmstadt) in einer Konzentration von 1:250 in PBS mit 1 % BSA bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal 5 min mit PBS gewaschen, dann wurden die Peroxidasen im Gewebe mit 3 % H₂O₂ in PBS 5 min bei Raumtemperatur inaktiviert und daraufhin wieder dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Streptavidin-Peroxidase (Sigma, Steinheim) wurde 1:400 in PBS verdünnt und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert, es folgte dreimaliges Waschen in PBS. Zur Detektion wurden die Schnitte 10 min in Tris-Puffer gelegt, dann 9 min in Diaminobenzidin (DAB, Zytomed, Berlin) als Peroxidase-Substrat, erneut 5 min in Tris-Puffer und schließlich 1 min in ddH₂O. Für die Kernfärbung wurde 1 min in Hämalaun (Merck, Darmstadt) gefärbt, dann kurz mit Leitungswasser gespült, dreimal in 1 % HCL (Sigma, Steinheim) getaucht, 5 min unter fließendem Wasser gespült und zuletzt 1 min in ddH₂O gewaschen. Als Eindeckmedium wurde Aquatex (Merck, Darmstadt) benutzt, die lichtmikroskopischen Bilder der Schnitte wurden mit einem Zeiss Axio Observer.Z1 Mikroskop und der AxioVision Software Version 4.8.20 (beides Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) aufgenommen.

3.15.4 Quantitative Auswertung mit dem Programm ImageJ

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte mit dem Programm ImageJ v.1.44p (National Institutes of Health, Bethesda, USA, ttp://rsbweb.nih.gov/ij/) unter Verwendung des Plugins *Colour Deconvolution*. Dieses vermag die Farbkanäle der Kernfärbung von denen der spezifischen DAB-Färbung zu diskriminieren (Abb. 4). Durch Bestimmung eines über die gesamte Serie konstanten Schwellenwertes kann der Hintergrund eliminiert werden. In fünf manuell definierten Arealen pro Schnitt, entweder in der Epidermis der Präparate gesunder Haut oder im Tumorgewebe der SCC-Präparate, wurde der Anteil an spezifischem Signal im Verhältnis zur Gesamtfläche (*area fraction*) ermittelt. Der Mittelwert dieses Signals wurde auf den Mittelwert des Hämalaun-Signals derselben Fläche normiert.



Abb. 4 Bearbeitung von Bildern spezifisch gefärbter Gefrierschnitte mit dem Plugin Colour Deconvolution des Programmes ImageJ. Das Bild des HA-DAB- und kerngefärbten Präparates wurde mittels des Plugins Colour Deconvolution für das Programm ImageJ der spezifischen Komponenten entsprechend in die Farbkanäle braun und blau dividiert. Die Normierung des HA-Signals auf das Hämalaun(HÄM)-Signal ermöglicht einen quantitativen Vergleich der HA-Menge in Epidermis und Tumorgewebe.



3.16 Metaanalyse von Microarrays gesunder Epidermis und SCCs

Der Unterschied in der Genexpression von matrixassoziierten Genen (Tabelle 4) wurde vergleichend zwischen gesunder humaner Epidermis und humanen SCCs untersucht. Hierzu wurden Microarray-Ergebnisse aus fünf publizierten Studien (GSE84293, GSE32628, GSE53462, GSE45164, GSE2503) verwendet. Zur Vermeidung eines Batch-Effects wurde eine Normalisierung anhand von konstitutiv exprimierten Genen durchgeführt. Mein Dank für die Durchführung der Metaanalyse geht an Dr. Katharina Gorges.

Tabelle 4 Matrixassoziierte Gene	
--	--

Gen	Produkt
ADAMDEC1	ADAM like decysin 1
ADAMTS1	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1
ADAMTS2	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2
ADAMTS4	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4
ADAMTS5	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5
ADAMTS9	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 9
BGN	Biglycan
CDH1	Cadherin-1
CDH2	Cadherin-2
CD44	Cluster of Differentiation 44
COL3A1	Kollagen Typ III, Alpha 1
FN1	Fibronectin 1
HAS1	Hyaluronan Synthase 1
HAS2	Hyaluronan Synthase 2
HAS3	Hyaluronan Synthase 3
HSPG2	Perlecan
HYAL1	Hyaluronidase 1
HYAL2	Hyaluronidase 2
ITGA4	Integrin Subunit Alpha 4
ITGB1	Integrin β-1
KRT5	Keratin 5
LUM	Lumican
MMP1	Matrix-Metalloprotease-1
MMP2	Matrix-Metalloprotease-2
MMP3	Matrix-Metalloprotease-3
MMP9	Matrix-Metalloprotease-9
MMP13	Matrix-Metalloprotease-13
SERPINA3	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade A, Member 3
SERPINB1	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B, Member 1
SPP1	Osteopontin
THBS1	Thrombospondin 1
VCAN	Versican
VIM	Vimentin

3.17 Statistik

Alle experimentellen Daten sind als arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Dem jeweiligen Versuchsaufbau entsprechend erfolgte die statistische Auswertung durch einen ungepaarten t-Test oder eine einfaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) mit Bonferroni *Post-Hoc*-Test. Ein p-Wert <0,05 wurde hierbei als statistisch signifikant angesehen. Die Signifikanzanalysen wurden mithilfe der Software Graphpad Prism[®] 5.02 (GraphPad Software, San Diego, USA) realisiert.

Α

4 Ergebnisse

4.1 Matrix-assoziierte Gene in SCC

In einer Metaanalyse von Microarray-Ergebnissen wurde die mRNA-Expression von insgesamt 33 Matrix-assoziierten Genen in SCCs und GH verglichen. Es zeigte sich vor allem die mRNA von Genen in SCCs erhöht, welche mit dem Abbau der extrazellulären Matrix in Zusammenhang gebracht werden (Abb. 5).



Abb. 5 Unterschiede der mRNA-Expression von Matrix-assoziierten Genen in gesunder menschlicher Haut und Plattenepithelkarzinomen. (A) Die mRNA-Expression von Matrix-assoziierten Genen (blaue Punkte = Matrix-abbauende Enzyme, gelbe Vierecke = Matrix-aufbauende Enzyme) wurden in Proben von gesunder menschlicher Haut (GH) und von Plattenepithelkarzinomen (SCC) mittels Metaanalyse korreliert.

Zudem wurde in SCCs verglichen mit gesunder Haut eine starke Anreicherung der mRNA von HAS3 (8,51 \pm 0,68), HYAL1 (106,3 \pm 6,64) und HYAL2 (8,58 \pm 0,53) detektiert, welche zentrale Gene des Hyaluronan-Systems sind. Besonders ausgeprägt imponierte der Unterschied für das Hyaluronan-degradierende Gen HYAL1 (Abb. 6).



Abb. 6 Unterschiede der mRNA-Expression von Genen des Hyaluronansystems in gesunder menschlicher Haut und Plattenepithelkarzinomen. (A) Die mRNA-Expressionen der Hyaluronansynthase 3 (HAS3) und der beiden Hyaluronidasen (HYAL) 1 und HYAL2 waren in Plattenepithelkarzinomen (SCC) verglichen mit gesunder Haut (GH) signifikant erhöht. Mittelwerte ± SEM, n=33-44, p, *** <0,001 vs. GH.

4.2 HA und am HA-Metabolismus beteiligte Proteine in SCC in vivo

Wie einleitend erklärt, wird in der Literatur eine erhöhte Menge an HA in der EZM hochdifferenzierter SCCs beschrieben. Daher wurde zunächst eine quantitative Untersuchung der HA-Menge immunhistochemisch angefärbter Paraffinschnitte klinischer Proben durchgeführt. Die Entitäten waren gesunde Haut (GH), Keratosen (AK) und Plattenepithelkarzinome (SCC). Es konnte bestätigt werden, dass der HA-Gehalt des epidermalen Gewebes der AKs (4,25 \pm 0,78) und SCCs (5,5 \pm 0,59), verglichen mit jenem der Epidermis gesunder Haut (1,25 \pm 0,27), signifikant erhöht war (Abb. 7).


Abb. 7 Hyaluronanexpression in gesunder Haut, aktinischer Keratose und Plattenepithelkarzinom. (A) HA wurde immunhistochemisch in Paraffinschnitten gesunder menschlicher Haut (GH), aktinischer Keratosen (AK) und von Plattenepithelkarzinomen (SCC) angefärbt. (B) Die Normierung des HA-Signals (braun) auf das HÄM-Signal im epidermalen Gewebe zeigte eine signifikante Erhöhung der HA-Level in AK und SCC gegenüber GH. Mittelwerte ± SEM, n=3, p, * <0,05 vs. GH, p, ** <0,01 vs. GH.

4.3 HA und am HA-Metabolismus beteiligte Proteine in SCCZ in vitro

In vitro wurden normale humane epidermale Keratinozyten (NHEKs) und Plattenepithelkarzinomzellen (SCCZ) separat in Kultur genommen. Ziel war es, die Mechanismen in Physiologie und Pathologie des HA-Metabolismus der jeweils prädominanten Zellarten der gesunden Epidermis und des Plattenepithelkarzinoms zu analysieren.

4.3.1 Evaluation der HA-Menge

24 h nach Aussaat wurde der HA-Gehalt im Überstand von nativen NHEKs und SCCZ mittels ELISA untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an HA im Überstand der SCCZ signifikant erhöht war (1,54 ± 0,11 vs. NHEK) (Abb. 8).



Abb. 8 Unterschied des HA-Gehalts im Überstand
von normalen humanen epidermalenKeratinozyten und Plattenepithelkarzinomzellen.Plattenepithelkarzinomzellen (SCCZ) zeigten im
Vergleich mit Keratinozyten (NHEK) eine erhöhte HA-
Menge im Überstand, nachgewiesen durch einen auf
biotinyliertem HA-Bindeprotein beruhendem Test.Mittelwerte ± SEM. n= 6-12, p, **<0,01 vs. NHEK.</td>

4.3.2 Analyse HA-synthetisierender und -degradierender Proteine

In Bezug auf die vorab erfolgte Metaanalyse der HA-synthetisierenden und -degradierenden Proteine der humanen Proben sollte das Resultat nun auch in der Zellkultur überprüft werden. Festzustellen war eine erhöhte Transkription der mRNA von HAS3 und der von HYAL1 und 2 in SCCZ gegenüber NHEKs. Die HYAL1-mRNA war signifikant erhöht (3,73 ± 0,57 vs. NHEK) (Abb. 9), HAS3 und HYAL2 mit deutlicher Tendenz zur Erhöhung (1,82 ± 0,56 und 2,14 ± 0,99 vs. NHEK).



Abb. 9 Unterschiede der mRNA-Menge von hyaluronansynthetisierenden und -degradierenden Proteinen in NHEK verglichen mit SCCZ. Die mRNA-Menge der HAS3 und HYAL1-2 in NHEK und SCCZ wurde mittels *realtime* RT-PCR analysiert. HYAL1 war in SCCZ signifikant gegenüber NHEK erhöht. Mittelwerte ± SEM. n=6-11; p, ** <0,01.



Abb. 10 Immunzytochemischer Vergleich von NHEK und SCCZ. (A) Repräsentative Bilder von NHEK und SCCZ, in denen HAS3, HYAL1 und HYAL2 angefärbt und mit einem Zeiss Axio Imager Mikroskop analysiert wurden. Es zeigte sich eine erhöhte Anzahl HYAL1-positiver, vesikelartiger Strukturen pro Zelle in SCCZ gegenüber NHEKs. Hinsichtlich der HYAL2-Färbung konnte kein Unterschied festgestellt werden. (B) Vergrößerte Darstellung der SCCZ aus A. HYAL1-positive, vesikuläre Strukturen sind mit Pfeilen markiert. (C) Die Quantifizierung der HYAL1-positiven Vesikel ergab eine signifikant Erhöhte Anzahl in SCCZ im Vergleich zu NHEK. Mittelwerte ± SEM. n= 6-8, p, **<0,01 vs. NHEK.

Weiterhin wurde mithilfe einer immunzytochemischen Färbung der Gehalt entsprechender Proteine visualisiert. Die Hyal1-Färbung zeigte eine vesikuläre Verteilung. Die Anzahl der einzelnen Vesikel pro Zelle war in SCCZ signifikant erhöht (1,76 ± 0,19 vs. NHEK). In der HYAL2-Färbung konnte kein Unterschied zwischen NHEKs und SCCs gezeigt werden (Abb. 10)

4.3.3 Analyse HA-spezifischer Rezeptoren

Im Folgenden sollten auch für Zell-Matrix-Interaktionen bedeutende Rezeptoren betrachtet werden, da diesen als Bindeglied zwischen EZM und Zelle eine besondere Stellung in der Tumorforschung zukommt. Ausgewählt wurden die HA-spezifischen Rezeptoren RHAMM und CD44. Wie oben erfolgte eine Analyse der mRNA-Menge in SCCZ im Verlgeich zu NHEK. Es konnte eine signifikante Erhöhung der Transkription von RHAMM in SCCZ im Vergleich zu NHEK gezeigt werden (7,06 ± 1,07 vs. NHEK). Die Menge an CD44-mRNA war betrachtet in SCCZ gegenüber NHEK nicht deutlich erhöht (0,91 ± 0,026 vs. NHEK) (Abb. 11).



Abb. 11 Unterschiede der mRNA-Menge von HA-spezifischen Rezeptoren in SCCZ verglichen mit NHEK. Die mRNA-Menge der beiden HA-spezifischen Rezeptoren *Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility* (RHAMM) und CD44 wurde in NHEK und SCCZ mittels *realtime* RT-PCR analysiert. RHAMM zeigte eine signifikante Erhöhung in SCCZ vs. NHEK, während der CD44-mRNA-Gehalt sich nur gering unterschied. Mittelwerte ± SEM. n= 3-4, p, **<0,01 vs. NHEK.

4.3.4 Unterschiede in der HA-Größendistribution

HA findet sich im Körper in vielen verschiedenen Größenvarianten, die in Abhängigkeit ihrer Größe in positiver oder negativer Weise Einfluss auf Zellwachstum, -beweglichkeit und –überleben nehmen können (s. 1.4.3). Diese Eigenschaften machen HA auch bei der Betrachtung des Verhaltens von Tumorzellen interessant. Im Folgenden sollte die Größe der von NHEKs und SCCZ *de novo* synthetisierten HA bestimmt und verglichen werden. HA wurde durch Zugabe von [³H]-Glukosamin markiert und über eine Sephacryl-S1000-Säule aufgetrennt. Frühe Fraktionen entsprechen großen, schnell eluierenden Molekülen, späte bilden die kleinen, langsamen Fragmente ab. Die HA-Synthese der NHEKs zeigte eine gleichmäßige Verteilung der Fraktionen mit flachem Anstieg Richtung späte Fraktionen, während SCCZ im mittleren Fraktionsbereich deutlich unter dem Niveau der NHEKs blieben und nach steilem Anstieg ein Maximum bei späten Fraktionen aufwiesen (Abb. 12).



Abb. 12 Größenausschlusschromatographie *de novo* synthetisierten Hyaluronans im Überstand von NHEK und SCCZ. HA wurde bei der *de novo* Synthese durch NHEK und SCCZ mit [³H]-Glukosamin markiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung nach Größe durch eine Sephacryl-S1000-Säule. SCCZ wiesen einen Gipfel bei stark fraktionierter HA und niedrige Werte im mittleren Fraktionsbereich auf. NHEKs zeigten eine gleichmäßigere Verteilung der Fraktionen mit leichtem Anstieg zur stärkeren Fraktionierung hin. n=3

4.4 Einfluss der HA-Matrix auf SCC in vivo

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, welche Auswirkungen Modulationen der HA-Matrix auf das Tumorgewebe haben. Es wurden unterschiedliche Ansätze *in vivo* und *in vitro* verfolgt. Im Tierversuch wurde eine Reduktion der HA-Produktion durch den HA-Syntheseinhibitor 4-Methylumbelliferon (4-MU) angestrebt, um die Effekte eines verringerten HA-Gehalts zu betrachten. In der Zellkultur sollten die Wirkungen unterschiedlich großer HA-Fragmentierungen auf SCCZ betrachtet werden.

4.4.1 Reduktion der Tumorzahl durch 4-MU

In Vorversuchen wurden Mäuse 20 Wochen lang, dreimal wöchentlich mit UVB bestrahlt ($80mJ/cm^2$). Während des Experiments erhielten sie entweder 4-MU-haltiges oder Kontrollfutter. Wöchentlich wurde die Zahl der Tumore erhoben, erste SCCs zeigten sich nach zehn Wochen Bestrahlung. Kontrollen mit und ohne 4-MU-Gabe, die jeweils nicht bestrahlt wurden, wiesen keine Tumore auf. Über den gesamten Zeitraum entwickelten mit 4-MU gefütterte Tiere unter UVB-Bestrahlung signifikant weniger Tumore als die Gruppe der UVB-bestrahlten ohne 4-MU-Fütterung (18,25 ± 2,22 mit 4-MU und UVB vs. 33,3 ± 4,1 ohne 4-MU und mit UVB) (Abb. 13).



Abb. 13 4-Methylumbelliferon inhibiert das Wachstum von Plattenepithelkarzinomen bei Mäusen unter UVB-Bestrahlung. Die Zahl der Plattenepithelkarzinome (SCC) wurde wöchentlich erhoben. Beginnend zehn Wochen nach der initialen Bestrahlung, wurden erste Tumore makroskopisch sichtbar. Unbehandelte (Kontrolle) und mit 4-Methylumbelliferon (4-MU) behandelte, nicht bestrahlte Gruppen zeigten keine Tumore. Über den gesamten Zeitraum entwickelten die mit 4-MU gefütterten Mäuse unter UVB-Bestrahlung signifikant weniger Tumore als jene die kein 4-MU erhielten und UVB-bestrahlt wurden. Mittelwerte ± SEM. n=5-12; p, *** <0,001 vs. UVB

4.4.2 Evaluation der HA-Menge

Aus den zum Zeitpunkt der zweiten Biopsie entnommenen Hautproben wurden Gefrierschnitte angefertigt und immunhistochemisch auf HA angefärbt. Das HA-Signal war in den Proben von den mit 4-MU gefütterten Mäusen verglichen mit der Kontrollgruppe tendenziell verringert. UVB-bestrahlte Tiere zeigten invasive SCCs, während mit 4-MU und UVB-Strahlung behandelte weniger oder keine SCCs aufwiesen.

Α

В









Abb. 14 Erhöhter HA-Gehalt in UVB-induzierten Plattenepithelkarzinomen bei Mäusen. (A) Zum Zeitpunkt der zweiten Biopsie entnommene Gefrierschnitte wurden immunhistochemisch auf HA und Hämalaun (HÄM) angefärbt. (B) 4-MU-Behandlung führte zu leicht, aber nicht signifikant verringerter Färbeintensität verglichen mit Kontrollhaut (KS). UVB-bestrahlte Tiere zeigten invasive SCCs, während mit 4-MU und UVBbehandelte weniger oder keine Tumore aufwiesen. Die HA-Menge war in SCC-Regionen im Vergleich zu gesunden Hautregionen signifikant erhöht. n=3-6; p,*<0,05 KS-UVB vs. Kontrolle

^{*} 1.5-1.0-0.5-0.0-^{*} 4.^{NU} ^{*} ^{*} ^{*} ^{*} ^{*} Die in der Epidermis der gesunden murinen Haut gering ausgebildete HA-Matrix wurde unter Bestrahlung stark amplifiziert. Eine quantitative Auswertung der gefärbten Schnitte (s. 3.15.4) zeigte eine signifikant erhöhte HA-Menge im epidermalen Gewebe der Tumore im Vergleich zur Epidermis der Kontrolltiere. Die 4-MU-Behandlung führte unter Bestrahlung zu einer Verringerung des HA-Signals, die aber nicht statistisch signifikant war (Abb. 14).

4.5 Einfluss der HA-Matrix auf SCCZ in vitro

Die nachfolgenden mechanistischen Untersuchungen dienten der näheren Betrachtung der Effekte modulierter HA-Matrix auf SCCs. Im *in vitro* Modell sollte an SCC-Zellen und Keratinozyten analysiert werden, auf welcher Grundlage die *in vivo* beobachtete Reduktion der Tumorzahl basiert.

4.5.1 Verringerung der HA-Menge durch 4-MU

Um die *in vivo* beobachteten Effekte von 4-MU auf zellulärer Ebene nachvollziehen zu können, wurde zunächst analysiert wie sich eine Stimulation mit 4-MU auf die HA-Menge im Überstand von SCC-Zellen auswirkt. Durch einen bHABP-basierten Test konnte nachgewiesen werden, dass die 24-stündige Inkubation mit 100 μ M 4-MU zu einer signifikant reduzierten Sekretion von HA ins Medium führte (Abb. 15) (0,622 ± 0,081 vs. Kontrolle).



Abb. 15 4-MU reduziert die HA-Sekretion von SCCZ. Die Stimulation der SCCZ mit 100 μ M 4-MU reduzierte die Sekretion von HA ins Medium signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte ± SEM. n=3, p,**<0,01 vs. Kontrolle (K)

4.5.2 Antiproliferative Wirkung von 4-MU

Zur Evaluation der Wirkung von 4-MU auf die Proliferation der SCCZ wurde der Einbau von [³H]-Thymidin bestimmt. Als Nebenaspekt sollte eine alternative Methode zur Messung Proliferationsrate überprüft der und etabliert werden. Die Fluoreszenzmessung von CFSE im Durchflusszytometer kommt ohne Radioaktivität aus und eignet sich, wie unter 3.9.2 erläutert, ebenfalls als Instrument um die Teilungsrate von Zellen abzubilden. Infolge des veränderten Versuchsaufbaus wurde für diese Messungen der Zeitraum der Stimulation auf 48 h verlängert. Beide Methoden zeigten eine signifikante Proliferationshemmung der SCCZ bei einer 4-MU Konzentration von 100 μM über 24 ([³H]-Thymidin, Abb. 16 A), beziehungsweise 48 h (CFSE, Abb. 16 B) (0,421 ± 0,125 bzw. 0,723 ± 0,027 vs. Kontrolle). Über den längeren Zeitraum von 48 h fällt die Differenz sowohl der Positivkontrolle als auch der mit 4-MU behandelten Zellen gegenüber den nicht stimulierten Kontrollen geringer aus.



Abb. 16 Antiproliferative Wirkung von 4-MU auf SCCZ. (**A**) Mittels [³H]-Thymidininkorporation über 6 h konnte nachgewiesen werden, dass eine 24-stündige Stimulation mit 100 μ M 4-MU die Proliferation von SCCZ signifikant hemmt. (**B**) Dieses Ergebnis konnte für einen Zeitraum von 48 h durch Emissionsmessung von Carbofluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) im Durchflusszytometer bestätigt werden. Positivkontrolle war zehnprozentiges Fetales Kälberserum (FCS). Mittelwerte ± SEM. n=3-4, p,*<0,05 vs. Kontrolle (K), p, ***<0,001 vs. K

4.5.3 Migrationshemmung durch 4-MU

Die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen ist ein entscheidender Parameter für die Bildung von Metastasen und damit die Malignität eines Tumors. Daher sollte die Wirkung von 4-MU auf die Migrationsfähigkeit von SCCZ untersucht werden. Über einen Zeitraum von 6 h wurden die Zellen in einer modifizierten Boyden-Kammer mit 100 μ M 4-MU inkubiert. Die Zahl der durch die Membran der Boyden-Kammer migrierten Zellen war unter Einfluss von 4-MU tendenziell verringert (0,684 ± 0,112 vs. Kontrolle). Als Positivkontrolle wurde FCS in einer Konzentration von 10 % verwendet (Abb. 17).



Abb. 17 4-MU wirkt migrationshemmend auf SCCZ. In der modifizierten Boyden-Kammer zeigte eine sechsstündige Inkubation mit 4-MU eine tendenziell migrationshemmende Wirkung auf SCCZ gegenüber unstimulierten Kontrollzellen. FCS diente als Positivkontrolle. Mittelwerte ± SEM. n=3, p,*<0,05 vs. Kontrolle (K)

4.5.4 Proapoptotische Einflüsse von 4-MU

Als weiterer Aspekt der Tumor-EZM-Interaktion wurde eine mögliche apoptotische Wirkung von 4-MU auf SCCs untersucht. Dafür wurde im Durchflusszytometer die Fluoreszenz von Alexa-Fluor®-488-Annexin-V gemessen (Abb. 18 C) und quantifiziert (Abb. 18 D). Dieses bindet an das während der Apoptose auf die Membranaußenseite verlagerte Phosphatidylserin. Als Positivkontrolle wurde 2 μ M Staurosporin verwendet. Proteinbiochemisch wurde das, im Zuge des programmierten Zelltodes entstehende, Poly(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase (PARP)-Spaltprodukt quantifiziert (Abb. 18 A) und ins Verhältnis zur PARP-Gesamtmenge gesetzt (Abb. 18 B). Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass 4-MU einen signifikant proapoptotischen Effekt auf SCC-Zellen hat (4 ± 0,449 und 5,2 ± 1,03 vs. Kontrolle). Dieser Effekt ließ sich in der Zellkultur auch lichtmikroskopisch über einen Zeitraum von 24 h beobachten (Abb. 18 E).



Abb. 18 4-MU induziert Apoptose in SCCZ. (**A**) Western Blot mit vermehrter Poly(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase (PARP)-Spaltung unter 24-stündiger Stimulation mit 100 μ M 4-MU. (**B**) Quantitative Analyse des PARP-Spaltproduktes (89 kD) bezogen auf nichtgespaltene PARP (116 kD). (**C**) Erhöhte Emission mit 4-MU behandelter und mit Annexin V markierter SCCZ im Durchflusszytometer. (**D**) Die quantitative Analyse der Durchflusszytometermessung zeigt, dass 4-MU signifikant den Anteil apoptotischer Zellen erhöht. (**E**) Lichtmikroskopische Aufnahme einer Stimulation der SCCs mit 100 μ M 4-MU über 24 h. Apoptotische Zellen sind durch Pfeile markiert. Mittelwerte ± SEM. n=3, p,**<0,01 vs. Kontrolle (K)

100 µm

100 µm

100 µm

4-MU

4.5.5 Effekte von fragmentierter HA auf SCCZ

Aufgrund der in der realtime RT-PCR ersichtlichen Erhöhung der mRNA-Menge von HYAL1 und 2 sollte in den folgenden Versuchen überprüft werden, wie sich ein veränderter Gehalt an HA und HA-Fragmenten in der SCCZ-Kultur auf Tumorzellwachstum und Malignität auswirkt. Dazu wurden SCCZ mit verschiedenen Faktoren stimuliert und daraufhin deren proliferative Aktivität durch Fluoreszenzmessungen im Durchflusszytometer bestimmt. Vorbereitend wurden niedrigmolekulare (LMW) **HA-Fragmente** durch Ultraschall-Degradation der hochmolekularen HA Healon5[®] erzeugt, deren Größe in einer Agarose-Gelelektrophorese verifiziert wurde. Als Laufkontrolle diente dabei unbehandelte hochmolekulare (HMW) HA. Zur Erstellung einer Positivkontrolle wurde HA mittels Hyaluronidase-Verdau degradiert. Eine 48-stündige Stimulation mit einer Konzentration

Α





Abb. 19 Niedrigmolekulare HA-Fragmente wirken proliferativ neutral. (A) Agarose-Gelelektrophorese zur Größenevaluation durch Ultraschall (US) degradierten Hyaluronans (HA). Als Kontrolle (K) dienten hochmolekulare HA und das nicht fraktionierte Healon5® (H5). Als Positivkontrolle wurde durch Hyaluronidase (HYAL) verdaute HA verwendet. (B) Weder eine 48-stündige Behandlung mit hochmolekularer H5-HA noch mit durch US erzeugten HA-Fragmenten in der Konzentration 100 µg/ml führte zu einer signifikanten Veränderung der Proliferation gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle (K). Mittelwerte ± SEM. n=3

von 100 μg/ml erbrachte keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation verglichen mit der Kontrolle (Abb. 19).

Für eine differenziertere Betrachtung erfolgte eine Stimulation über den gleichen Zeitraum mit kommerziell erworbenen 1000 und 150 kD großen HA-Oligomeren sowie acht Monosaccharide langen HA-Fragmenten in den Konzentrationen 10 und 100 μ g/ml. Diese zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 20 A-C).





Abb. 20 HA-Fragmente der Größen 1000 und 150 kD sowie Oktamere sind proliferativ neutral. Die Stimulation der SCCZ mit (A) 1000 und (B) 150 kD großen HA-Fragmenten sowie mit (C) Oktameren erbrachte für die Konzentrationen 10 und 200 μ g/ml keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation über 48 h. Als Positivkontrolle diente FCS 10 %. Mittelwerte ± SEM. n=3, p, ***<0,001 vs. Kontrolle (K)

Weiterhin wurde die Auswirkung erhöhten HMW-HA-Gehaltes sowie der Inhibition der HYALs durch 6-O-Palmitoyl-L-Ascorbinsäure (VCPAL) auf die proliferative Aktivität der SCCZ überprüft. Dabei konnte für die Konzentration 100 µg/ml HMW-HA und 100 µM VCPAL allein sowie in Kombination keine signifikante Änderung beobachtet werden (Abb. 21).



Abb. 21 Hochmolekulares HA und 6-O-Palmitoyl-L-Ascorbinsäure haben keinen Effekt auf die Proliferation in vitro. Stimulation der SCCZ mit 100 µg/ml hochmolekularen (HMW) HA und 100 µM des Hyaluronidaseinhibitors 6-O-Palmitoyl-L-Ascorbinsäure (VCPAL) führte nicht zu signifikanter Abnahme oder Zuwachs der Proliferation gegenüber der Kontrolle (K). Mittelwerte ± SEM. n=3

4.5.6 Parakriner Einfluss von Keratinozyten

Im folgenden Ansatz wurde die Wirkung von LMW-HA auf verschiedene parakrin sezernierte Zytokine untersucht, um mögliche Interaktionen zwischen SCCZ und Keratinozyten zu analysieren. Die Analyse mittels qRT-PCR zeigte, dass die Inkubierung von Keratinozyten mit 100 µg/ml LMW-HA zu einer signifikant geringeren Interleukin-6 (IL-6) Ausschüttung (0,567 ± 0,096 vs. Kontrolle) führte (Abb. 22 A). Eine Stimulation der SCCZ mit IL-6 in der Konzentration 1 µg/ml resultierte hingegen in einer signifikant verringerten Zellzahl (0,507 ± 0,079 vs. Kontrolle) (Abb. 22 B).



Abb. 22 Protektiver Effekt von niedrigmolekularem HA auf SCCZ. (A) Stimulation von Keratinozyten mit niedrigmolekularem HA (US-HA) führte zu einer signifikanten Verringerung der produzierten Interleukin-6 (IL-6) Menge. (B) Die Stimulation der SCCZ mit IL-6 resultierte in einer signifikant geringeren Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K). Mittelwerte ± SEM. n=3-4, p, **<0,01 vs. K

Die Messung des mRNA-Gehalts der Zytokine IL-1 β , IL-8, TNF- α , TGF- β 1 und VEGF-A zeigte unter Stimulation mit LMW-HA keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 23 A). Auch für den zytoplasmatischen Effektor *Integrinlinked kinase* (ILK) konnte keine signifikante Änderung gezeigt werden (Abb. 23 B).



Abb. 23 mRNA-Gehalt unterschiedlicher Zytokine in NHEK nach Stimulation mit niedrigmolekularem HA. (A) Stimulation der Keratinozyten mit US-HA zeigt keine signifikanten Unterschiede des produzierten mRNA-Gehalts der Zytokine IL-1 β , IL-8, TNF- α , TGF- β 1 und VEGF-A verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (K). (B) Für die Protein-Kinase ILK vs. K konnte ebenfalls keine signifikante Änderung gezeigt werden. Mittelwerte ± SEM. n=3-4

5 Diskussion

5.1 HA und am HA-Metabolismus beteiligte Proteine in SCC in vivo

HA hat im Organismus vielfältige Funktionen und Wirkungen, welche teilweise konträr erscheinen. In seiner chemischen Struktur präsentiert es sich wenig komplex als unverzweigter Disaccharidstrang. Daher liegt es nahe, die Ursache seiner Multifunktionalität in der differentiellen Distribution durch auf- und abbauende Proteine sowie im Zusammenwirken mit seinen Effektoren zu vermuten. Auch in der Pathophysiologie von Tumorerkrankungen zeigt HA verschiedene Wirkungsweisen, die Tumorwachstum und Malignität positiv und negativ beeinflussen können [49].

Vor dem Hintergrund von den in immunhistochemischen Färbungen vorbeschriebenen Expressionsmustern von HA in SCC [83] erfolgte die quantitative Analyse von HA in SCC-Tumorgewebe, epidermalem Gewebe gesunder Haut und der Tumorvorstufe aktinische Keratose. Hier zeigte sich eine Tendenz zunehmender HA-Menge von gesunder Epidermis über aktinische Keratosen hin zum Plattenepithelkarzinom. Dies korreliert mit der Annahme, dass viele Tumore im Laufe ihrer Entwicklung vermehrt HA exprimieren [67]. Hier muss jedoch zwischen Tumorzelle und Tumorstroma unterschieden werden. In frühen Tumorstadien ist der HA-Gehalt der Tumorzellen zunächst erhöht, im Verlauf von niedrig- zu hochmalignen epithelialen Tumoren nimmt die HA-Menge in Tumorzellen jedoch wieder ab [84]. So weisen Patienten mit oralem SCC mit geringerem HA-Gehalt und irregulärem HA-Verteilungsmuster in Tumorzellen eine niedrigere 5-Jahres-Überlebensrate auf [68]. Im Tumorstroma hingegen ist der HA-Gehalt bei vielen Tumorentitäten direkt mit dem Malignitätsgrad korreliert und bleibt auch in niedrig differenzierten Stadien erhöht [67]. Bei Brustkrebspatienten beispielsweise indiziert ein erhöhtes stromales HA eine verminderte Überlebensrate [85]. Karvinen et al. beschreiben ein starkes HA-Signal im Gewebe von in situ SCC der Haut und eine Verminderung in Proben invasiver SCC [83]. Daher wäre ein Grading der analysierten Schnitte interessant, um eine Aussage zum tatsächlichen Verhältnis des HA-Gehalts zwischen AK und SCC in verschiedenen Stadien treffen zu können. Aus den

genannten Beispielen wird ersichtlich, dass der HA-Gehalt im Tumorgewebe als signifikanter Indikator für Überleben und Malignität betrachtet werden und dadurch als prognostischer Parameter Relevanz in der klinischen Anwendung besitzen kann.

Die Menge und Wirkungen von HA und seinen Metaboliten stehen in direktem Zusammenhang mit der Induktion der an HA-Synthese und HA-Degradation beteiligten Proteine [86]. Die Beziehung von Tumormalignität und Ausprägung der am HA-Metabolismus beteiligten Proteine hingegen ist noch nicht abschließend geklärt. In einigen Tumorarten steigt der HA-Gehalt und damit auch der Malignitätsgrad im Kontext verringerter HYAL1-2-Expression [87]. Dieser Zusammenhang kann auch umgekehrt sein, wie für hochmaligne Läsionen gezeigt wurde [88]. Möglicherweise führt die Aktivierung von HA-abhängigen Signalwegen in verschiedenen Zell- und Tumorarten also zu divergierenden Effekten. Die Metaanalyse der mRNA-Menge von HAS1-3 und HYAL1-2 in Proben von SCC menschlicher Haut zeigte eine Erhöhung der HAS1 und 2, die jedoch nicht signifikant war, und eine signifikante Erhöhung für HAS3. Auch die Expression von HYAL1-2 war jeweils signifikant erhöht. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis auf einen starken HA-Metabolismus mit hoher HA-Synthese und gleichzeitig hohem Abbau zu HA-Degradationsprodukten sein. Dieser neue Ansatz kann zum besseren Verständnis der Rolle von HA in Entstehung und Verlauf von SCC der Haut beitragen und bietet die Grundlage zu weiterführender Forschung auf diesem Gebiet.

5.2 HA und am HA-Metabolismus beteiligte Proteine in SCCZ in vitro

In vitro wurde die Zelllinie A431, eine etablierte SCC-Zelllinie, und normale humane epidermale Keratinozyten getrennt kultiviert. Diese beiden Zellarten wurden jeweils repräsentativ für SCC und gesunde Epidermis gewählt. Keratinozyten stellen zellulär den Hauptanteil der Epidermis und sind dort für die reguläre Synthese von HA entscheidend [89, 90]. Zuerst wurde das Ergebnis der *in vivo* Analyse der HA-synthetisierenden und degradierenden Proteine *in vitro* überprüft. Es zeigte sich in der unbehandelten Monokultur der SCCZ eine signifikant erhöhte HA-Menge im Überstand, was ein Hinweis für eine verstärkte HA-Synthese in SCCZ Zellen sein kann. Weiterhin konnte eine erhöhte mRNA-Synthese für HAS3 und HYAL1-2 ausgemacht werden, im Fall von HYAL1 sogar hoch signifikant. Dies könnte für einen insgesamt erhöhten Umsatz von HA in SCCZ sprechen. Die vergleichende immunhistochemische Färbung von NHEK und SCCZ zeigte

eine vesikelartige Verteilung von HYAL1 im Zytoplasma von SCCZ, die sich bei NHEK nicht oder nur in signifikant geringerer Ausprägung darstellte. Diese Beobachtung ist besonders interessant, da nach bisherigem Forschungsstand HYAL1 in SCC-Zellen des Kopf- und Halsbereichs im Vergleich zu normalen Keratinozyten verringert ist [91]. Allerdings wurde HYAL1 in dieser Untersuchung eine kanzeroprotektive Wirkung zugeschrieben und die gegenläufige Ausprägung und Wirkung von HYALs in unterschiedlichen Zell- und Tumorarten ist bekannt [92]. In klinischen Studien werden rekombinante Hyaluronidasen aktuell bereits als Chemotherapeutikum in der Behandlung des Pankreaskarzinoms erprobt [93, 94]. Die nähere Betrachtung der Spleißvarianten verspricht hier weitere Einsichten [95].

In der mRNA-Analyse zeigte sich für den HA-spezifischen Rezeptor RHAMM eine starke Erhöhung in SCCZ gegenüber NHEK, während der HA-Rezeptor CD44 in beiden Zellarten etwa gleich stark exprimiert war. Erhöhte RHAMM-Expression hat sich in oralen SCC als prognostischer Faktor für ein schlechteres Staging erwiesen [27] und seine Blockierung in Epithelzellen führt zu geringerer Neovaskularisation [25]. Zudem ist eine RHAMM-Überexpression in Kopf- und Halstumoren mit einer geringeren 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert [96]. Die hohe Expression von RHAMM in SCCZ könnte folglich Migration und Angiogenese auch in SCC begünstigen und eine erhöhte Malignität bedeuten. Die im Vergleich mit NHEK nicht erhöhte CD44-Expression deutet nicht auf eine erhöhte HA-Bindung der SCCZ hin, was die Migration fördern kann [25]. Weiterhin können HA-Fragmente zu veränderter CD44-Rezeptoraktivierung führen und die Bindung an hochmolekulare HA verringern [97]. Das Ergebnis der Untersuchung der HA-Größe im Überstand von SCCZ im Vergleich zu NHEK mittels Größenausschlusschromatographie zeigte eine stärkere Fragmentierung von HA in der SCCZ-Kultur. Vor allem im Bereich der kleinen HA-Fragmente weisen SCCZ einen Gipfel auf. HA-Oligomere fördern mehrere Effekte, die das Tumorwachstum und -überleben begünstigen und sind in der Umgebung verschiedener Tumorentitäten zu finden [98]. Sie stimulieren die Gefäßneubildung im Gewebe [99], beeinflussen die inflammatorische Antwort auf Pathogene und steigern die Motilität in Fibroblasten. Interessanterweise scheint für Motilitätssteigerung und angiogene Effekte der Oligomere eine Interaktion mit RHAMM und seinen nachgeschalteten Signalwegen verantwortlich zu sein [100, 101]. Weiterführende

Experimente sollten die genannten Aspekte der Wirkungen von HA-Fragmenten in Bezug auf SCC der Haut näher untersuchen.

5.3 Einfluss der HA-Matrix auf SCC in vivo

Unter Bestrahlung mit UVB entwickelten die mit 4-MU behandelten Mäuse signifikant weniger Tumore als Tiere ohne 4-MU-Behandlung. Im Anschluss dieses Versuchs wurden die entnommenen Hautproben verarbeitet und immunhistochemisch auf HA angefärbt. Der Vergleich von Schnitten aus muriner Epidermis und SCCs mit dem aus menschlichen Proben gewonnenen Material wies Übereinstimmungen zwischen dem Muster der HA-Verteilung und Zunahme der HA-Menge in SCCs auf. Initial stellte sich in der dünneren Mausepidermis die HA-Menge geringer als beim Menschen dar. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Siiskonen et al. [102] zeigte sich nach UV-Bestrahlung eine Hyperplasie des epidermalen Gewebes mit verstärkter HA-Kumulation. In Tumorgewebe fiel die Steigerung der HA-Menge am stärksten aus, das Muster der Zell- und HA-Verteilung erschien gestört. Unter Gabe von 4-MU konnte in unbestrahlten Tieren nur ein geringer Unterschied des HA-Gehalts in der Epidermis im Vergleich zu gänzlich unbehandelten Mäusen ausgemacht werden. Das Verteilungsmuster von HA schien unverändert. Zwischen bestrahlten Tieren mit und ohne 4-MU-Behandlung zeigte sich in der quantitativen Auswertung ein nicht signifikant geringerer HA-Gehalt in der 4-MU-Gruppe, was ein Hinweis auf einen Kompensationsmechanismus bei der HA-Synthese der überlebenden Tumorzellen sein könnte. In dieser Hinsicht wäre eine quantitative mRNA-Untersuchung HA-synthetisierender Proteine der murinen Tumorzellen post radiationem interessant. Der Unterschied im HA-Gehalt zwischen bestrahlten Tieren ohne 4-MU-Behandlung und der Kontrollgruppe aus nicht bestrahlten Tieren ohne 4-MU-Behandlung fiel signifikant hoch aus. Dies bestätigt die These, dass die im Tumorgewebe vorhandene Menge an HA bei der Entstehung von UVB-induzierten SCC eine entscheidende Rolle spielt. Ebenso wichtig für die Art der zellulären Antwort scheint die Dauer und Dosis der Bestrahlung zu sein. Unter einmaliger UVB-Bestrahlung kommt es nach zwei Tagen zuerst zu einem Anstieg von HA und HA-Synthasen in epidermalem Gewebe. In der Folge steigen jedoch die Hyaluronidasen an und die HA-Menge sinkt bis Tag fünf [103]. Andauernde UV-Strahlung führt hingegen zu einem kontinuierlich erhöhten HA-Gehalt [102]. Die signifikant

verminderte Tumorentwicklung in der 4-MU-Gruppe unter Bestrahlung könnte also auf die HA-Depletion maligner Zellen durch 4-MU zurückzuführen zu sein. Ähnliche Hemmungen des Tumorwachstums wurden bereits einleitend für Brustkrebs [75] und malignes Melanom [73, 74] aufgeführt, weitere Beispiele sind die Unterdrückung von Proliferation und Metastasierung des Osteosarkoms [104] und die umfassende Antitumor-Aktivität gegenüber dem Prostatakarzinom [105].

5.4 Einfluss der HA-Matrix auf SCCZ in vitro

4-MU vermindert die HA-Menge im Überstand von Keratinozyten-Kulturen und verhindert deren Hyperproliferation Stimulation epidermalem nach mit Wachstumsfaktor [72]. Wie oben gezeigt konnte im Medium von SCCZ eine erhöhte HA-Menge gegenüber NHEK nachgewiesen werden. Kulttie et al. weisen ohne spezifische Datenangabe darauf hin, dass in ihren Untersuchungen Plattenepithelkarzinomzellen der Gesichtshaut unter 4-MU weniger HA ins Medium sezernierten [71]. Diese Beobachtung wird durch unsere Experimente mit der A431-Zelllinie unterstützt. Die Behandlung mit 4-MU führte weiterhin in der modifizierten Boyden-Kammer zu einer tendenziell geringeren Migration und auch die Proliferation der SCCZ wurde signifikant inhibiert. Dies deckt sich mit der sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesenen Migrations- und Proliferationshemmung von ösophagealen SCC-Zellen [30, 106]. Zur Proliferationsmessung wurde im Rahmen der mechanistischen Untersuchungen neben der [³H]-Thymidininkorporation auch eine alternative Methode, welche ohne Radioaktivität auskommt, verwendet. Die Messung der CFSE-Intensität im Durchflusszytometer erwies sich als geeignetes Surrogat um die Proliferation der SCCZ zu messen und wurde als Verfahren in weiteren Proliferationsversuchen angewandt.

Lichtmikroskopisch zeigten mit 4-MU behandelte Zellen über die Zeit vermehrt Zelluntergänge, die typische Anzeichen von Apoptose aufwiesen. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden mit Alexa-Fluor[®]-488-Annexin-V markierte Zellen durchflusszytometrisch untersucht und darüber hinaus proteinbiochemisch das Verhältnis von PARP zu seinem Spaltprodukt bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass 4-MU tatsächlich eine proapoptotische Wirkung auf SCCZ hat. Auch bei Brustkrebszellen [75, 107] und hepatozellulären Karzinomen [108] wurden bereits vergleichbare Effekte beobachtet. Dieses Ergebnis ist hinsichtlich der Bedeutung von 4-MU als Wirkstoff in der

Tumorbehandlung besonders relevant. Über eine mögliche Wachstums- und Metastasierungshemmung hinaus würden auch schon bestehende solide Tumore und Tumorzellen verringert.

Zur Analyse weiterer bisher nicht vollständig geklärter Aspekte der Tumor-Matrix-Interaktion wurden in vitro Experimente zur Wirkung von HA-Fragmenten verschiedener Größe sowie dem HYAL-Inhibitor VCPAL auf die Proliferation von SCCZ durchgeführt. Es wurden kommerziell erworbene Fragmente definierter Größe und durch Ultraschalldegradation selbst von HMW-HA gewonnene Fragmente im niedrigmolekularen Bereich verwendet. Es zeigte sich, dass Fragmente der definierten Größen 1000 kD, 150 kD und HA-Oktamere ebenso wie die niedrigmolekulare HA eigener Herstellung in den verwendeten Konzentrationen und Zeiträumen gegenüber Proliferation neutral wirken. Möglicherweise führte in dieser Versuchsanordnung eine quantitative oder qualitative Dominanz endogen synthetisierter HA zur Minderung von Effekten der in das Medium zugegebenen HA. Darüber Aufschluss geben könnte, ob 4-MU vermittelte Wirkungen durch Gabe definierter HA-Fragmente umzukehren oder zumindest abzuschwächen sind. In einem anderen Ansatz wurden SCCZ in Erwartung einer verstärkten Fragmentsynthese durch die erhöhte HYAL1-2-Expression allein mit HMW-HA als Zusatz inkubiert sowie mit dem HYAL-Inhibitor VCPAL [109] oder einer Kombination beider Stimuli. Auch in dieser Konstellation konnte kein positiver oder negativer Effekt auf die Proliferation von SCCZ gezeigt werden. Interessanterweise wurde in NHEK durch Stimulation mit US-HA Fragmenten das Zytokin IL-6 reguliert. Die mRNA-Expression von IL-6 verringerte sich signifikant, was sich mit bisherigen Erkenntnissen deckt [110]. SCCZ wiederum zeigten unter IL-6-Behandlung einen Rückgang der Zellzahl, wodurch die Vermutung der Modulation parakriner Einflüsse von NHEKs auf Tumorzellen durch einen veränderten HA-Metabolismus bestärkt wird. Im Gegensatz dazu scheinen Tumoren zu stehen, deren Genese auf chronischer Inflammation beruht. Hier besitzt IL-6 kanzerogene Eigenschaften [111]. Das in Matrix-Zell-Interaktionen involvierte Protein ILK zeigte keine erhöhte Expression unter LMW-HA-Stimulation, was auf Unabhängigkeit der HA-Effekte von Integrin-vermittelter Signalleitung hinweisen könnte. Da HA-Fragmente offensichtlich vielschichtige Wirkungen haben, die teilweise nur in definierten Größen, Konzentrationen und

Zeiträumen auftreten [18, 112], bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um definitive Aussagen zu Interaktionen mit SCCZ treffen zu können.

5.5 HA als Faktor für Entstehung und Progression von SCC

UV-Bestrahlung führt zu differentiellen Effekten im HA-Metabolismus. Initial steigt die HA-Menge in der Epidermis an und die Größe der HA-Stränge beträgt mehrheitlich um 1000 kD. Daraufhin kommt es zu einem Anstieg der Hyaluronidasen und die Größe der HA-Stränge nimmt auf ca. 100 kD ab, während die HA-Gesamtmenge gleichbleibt. Schließlich nimmt auch die HA-Gesamtmenge wieder auf das Niveau vor der Bestrahlung ab [103].

Unter chronischer UV-Bestrahlung bleibt HA in der Epidermis kontinuierlich erhöht und als gesichert darf angesehen werden, dass HA im Gewebe vieler Tumorarten verstärkt exprimiert wird, darunter auch im SCC der Haut (Abb. 24 A). In vitro wird in Keratinozyten die Ausschüttung von inflammatorischem IL-6 durch die Gabe von HA unterdrückt. Dies kann als Schutzmechanismus von Keratinozyten intakter Epidermis vor einer überschießenden inflammatorischen Reaktion des Körpers nach UV-Exposition gesehen werden, wie er auch *in vivo* durch eine erhöhte postexpositionelle HA-Synthese erreicht würde. In unseren Versuchen zeigte sich in vitro unter Gabe niedrigmolekularer HA eine verminderte IL-6-Produktion der NHEK. Die Gabe von IL-6 wiederum verminderte die Überlebensrate von SCCZ. Auch im Körper könnte eine Unterdrückung der inflammatorischen Immunantwort durch niedrigmolekulare HA eine gesteigerte Überlebensrate für maligne SCCZ bedeuten. Die kontinuierliche Erhöhung der HA-Produktion unter chronischer UV-Strahlung würde diesen Effekt noch begünstigen. In diesem Zusammenhang HA-Tetrasaccharide ist auch interessant, dass Apoptosevorgänge nach Hyperthermie zu unterdrücken scheinen [64]. Im Kontext der erhöhten HYAL-Expression bei SCCZ könnte dies deren Überlebenschance nach UV-Lichtexposition weiter verbessern. HYALs und ihre HA-Degradationsprodukte fördern Tumore außerdem durch Erhöhung der Migration, Proliferation und Angiogenese (Abb. 24 B).

In Prostatakarzinomen etwa führt HYAL1-Erhöhung zu einer vermehrten Bildung von Tumorzell-Vesikeln, die der Metastasierung vorausgehen. Eine erhöhte HA-Menge allein hingegen wirkt bei diesen Zellen protektiv [113]. In Bezug auf die verstärkte Bildung von

HYAL1 in SCCZ könnte die Behandlung mit 4-MU also durch eine Inhibition der HA-Produktion zu einem Substratmangel der HYALs und dadurch zu einer Hemmung der Migrationsfähigkeit der SCCZ führen. Die zahlreichen Effekte verschiedener HA-Größen könnten durch die erhöhte Expression des RHAMM-Rezeptors mit nachgeschalteten Signalwegen noch weiter verstärkt werden. In welcher Weise und wo genau in diesen vielschichtigen Prozessen 4-MU zu der nachgewiesenen Förderung von Apoptose führt, ist Ausgangspunkt fortführender Experimente.

Zusammenfassend scheint HA einen entscheidenden Faktor für Genese und Überleben von UV-induzierten SCC darzustellen. HA in verschiedenen Größendistributionen kann auf Ebene der Tumorprogression prokarzinogen wirken. SCC-Zellen unterscheiden sich in der HA-Menge und der Expression von HA-Rezeptoren, HA-Synthasen und Hyaluronidasen maßgeblich von NHEKs. Durch 4-MU wurde experimentell *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass durch Eingriffe in den HA-Metabolismus potentiell Wachstum, Migration und Überleben von SCC beeinflusst werden können und sich auf diese Weise die Malignität der Tumore verringern lässt.



Abb. 24 Einfluss von HA auf die Entwicklung UV-induzierter SCCs. (A) HA-Metabolismus durch NHEK der Epidermis nimmt auf Einfluss von UV-Strahlung hin zu. (**B**) Unter Einfluss parakriner Botenstoffe, darunter IL-6, wird die Apoptose in Tumorzellen aktiviert. Durch SCCZ vermehrt gebildete niedrigmolekulare HA vermindert die IL-6-Ausschüttung der NHEK, die Wahrscheinlichkeit der Apoptose sinkt. Erhöhte HA-Synthese und Degradierung von HA zu HA-Fragmenten begünstigt die Proliferation und Migration von SCCZ, das Plattenepithelkarzinom kann sich ausbilden und metastasieren. Die Faktoren der Pathogenese von Tumoren und damit auch deren malignes Potential können durch Eingriffe in den HA-Metabolismus, in dieser Arbeit realisiert durch die Gabe von 4-MU, direkt und entscheidend beeinflusst werden.

5.6 Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von HA auf Entstehung und Überleben von SCC untersucht. Die dargestellten vielschichtigen Effekte von HA und HA-Fragmenten können noch sehr umfassend erforscht und beeinflusst werden. Als Ziele kommen die am HA-Metabolismus beteiligten Proteine und HA-Rezeptoren in Frage. Ein möglicher Modulator der HA-Matrix steht in 4-MU als HA-Syntheseinhibitor zur Verfügung, auch HYAL-Inhibitoren und die Hyaluronidasen selbst können in Betracht gezogen werden.

Als vielversprechender Ansatz translationaler Forschung zur extrazellulären Matrix sollte die Inhibition der HA-Synthese durch 4-MU *in vivo* genauer in Bezug auf ihre Wirkungen untersucht werden. Gleiches gilt für eine *in vivo* Evaluation der proapoptotischen Wirkung von 4-MU. Die bisherigen Resultate lassen auf 4-MU als möglichen Wirkstoff zur Ergänzung einer klinischen Chemotherapie des Plattenepithelkarzinoms der Haut hoffen, auch weil der Einsatz am Menschen bereits erprobt ist.

Weiterhin sollten die Wirkungen von HA-Fragmenten und Hyaluronidasen genauer und umfassender analysiert werden. Diese Proteine und ihre Produkte sind bei der Veränderung der HA-Zusammensetzung in der EZM wahrscheinlich entscheidend für Ausprägungen in benigne oder maligne Veränderungen von Zellen. Die Fortsetzung mechanistischer Untersuchungen mit veränderten Variablen *in vitro* könnte hier wichtige Grundlagenkenntnisse bringen. Unter Berücksichtigung von bereits in therapeutischer Absicht durchgeführten klinischen Anwendungen von Hyaluronidasen bei Tumorerkrankungen könnten diese in Folge auch *in vivo* überprüft werden.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Kanitakis, J., *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin.* Eur J Dermatol, 2002. **12**(4): p. 390-9; quiz 400-1.
- 2. Fuchs, E., *Scratching the surface of skin development*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 834-42.
- 3. Fuchs, E., *Finding one's niche in the skin.* Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 499-502.
- Alam, M. and D. Ratner, *Cutaneous squamous-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2001.
 344(13): p. 975-83.
- 5. Brash, D.E., 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): p. 10124-8.
- Stiewe, T., *The p53 family in differentiation and tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2007.
 7(3): p. 165-8.
- 7. Bowden, G.T., *Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 23-35.
- 8. Ortonne, J.P., *From actinic keratosis to squamous cell carcinoma*. Br J Dermatol, 2002. **146 Suppl 61**: p. 20-3.
- 9. Zhang, W., et al., UVB-induced apoptosis drives clonal expansion during skin tumor development. Carcinogenesis, 2005. **26**(1): p. 249-57.
- 10. Brash, D.E., *Sunlight and the onset of skin cancer*. Trends Genet, 1997. **13**(10): p. 410-4.
- 11. Brash, D.E., *Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas.* Br J Dermatol, 2006. **154 Suppl 1**: p. 8-10.
- 12. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
- 13. Burnworth, B., et al., *The multi-step process of human skin carcinogenesis: a role for p53, cyclin D1, hTERT, p16, and TSP-1.* Eur J Cell Biol, 2007. **86**(11-12): p. 763-80.
- 14. Einspahr, J.G., et al., *Functional protein pathway activation mapping of the progression of normal skin to squamous cell carcinoma*. Cancer Prev Res (Phila), 2012. **5**(3): p. 403-13.
- 15. Bode, A.M. and Z. Dong, *Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction.* Sci STKE, 2003. **2003**(167): p. RE2.
- 16. Hynes, R.O., *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1216-9.
- 17. Lu, P., et al., *Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(12).
- 18. Stern, R., A.A. Asari, and K.N. Sugahara, *Hyaluronan fragments: an information-rich system.* Eur J Cell Biol, 2006. **85**(8): p. 699-715.
- Aruffo, A., et al., CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell, 1990.
 61(7): p. 1303-13.
- 20. Hardwick, C., et al., *Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility.* J Cell Biol, 1992. **117**(6): p. 1343-50.
- 21. Turley, E.A., P.W. Noble, and L.Y. Bourguignon, *Signaling properties of hyaluronan receptors.* J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4589-92.
- 22. Telmer, P.G., et al., *How does a protein with dual mitotic spindle and extracellular matrix receptor functions affect tumor susceptibility and progression?* Commun Integr Biol, 2011. **4**(2): p. 182-5.
- 23. Tolg, C., et al., *RHAMM promotes interphase microtubule instability and mitotic spindle integrity through MEK1/ERK1/2 activity.* J Biol Chem, 2010. **285**(34): p. 26461-74.

- 24. Tolg, C., et al., *Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 motogenic signaling, leading to defective skin wound repair.* J Cell Biol, 2006. **175**(6): p. 1017-28.
- 25. Savani, R.C., et al., *Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis.* J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36770-8.
- 26. Wang, C., M. Tammi, and R. Tammi, *Distribution of hyaluronan and its CD44 receptor in the epithelia of human skin appendages.* Histochemistry, 1992. **98**(2): p. 105-12.
- 27. Yamano, Y., et al., *Hyaluronan-mediated motility: a target in oral squamous cell carcinoma*. Int J Oncol, 2008. **32**(5): p. 1001-9.
- Niedworok, C., et al., The impact of the receptor of hyaluronan-mediated motility (RHAMM) on human urothelial transitional cell cancer of the bladder. PLoS One, 2013.
 8(9): p. e75681.
- 29. Kramer, M.W., et al., *Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis.* Cancer, 2011. **117**(6): p. 1197-209.
- 30. Twarock, S., et al., *Inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma progression by in vivo targeting of hyaluronan synthesis.* Mol Cancer, 2011. **10**: p. 30.
- 31. Toole, B.P., *Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(7): p. 528-39.
- 32. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 221-64.
- 33. Monslow, J., et al., *The human hyaluronan synthase genes: genomic structures, proximal promoters and polymorphic microsatellite markers.* Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(8): p. 1272-83.
- 34. Pruitt, K.D., et al., *RefSeq: an update on mammalian reference sequences*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D756-63.
- 35. Itano, N. and K. Kimata, *Mammalian hyaluronan synthases*. IUBMB Life, 2002. **54**(4): p. 195-9.
- 36. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties.* J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25085-92.
- 37. Csoka, A.B., G.I. Frost, and R. Stern, *The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes.* Matrix Biol, 2001. **20**(8): p. 499-508.
- 38. Stern, R. and M.J. Jedrzejas, *Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action.* Chem Rev, 2006. **106**(3): p. 818-39.
- 39. Frost, G.I., et al., *Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(1): p. 10-5.
- 40. Erickson, M. and R. Stern, *Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism.* Biochem Res Int, 2012. **2012**: p. 893947.
- 41. Gasingirwa, M.C., et al., *Endocytosis of hyaluronidase-1 by the liver*. Biochem J, 2010. **430**(2): p. 305-13.
- 42. Harada, H. and M. Takahashi, *CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2.* J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5597-607.
- 43. Knudson, W., G. Chow, and C.B. Knudson, *CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan.* Matrix Biol, 2002. **21**(1): p. 15-23.
- 44. Tammi, R., et al., *Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism.* J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 35111-22.
- 45. Thankamony, S.P. and W. Knudson, *Acylation of CD44 and its association with lipid rafts are required for receptor and hyaluronan endocytosis.* J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34601-9.
- 46. Duterme, C., et al., *Two novel functions of hyaluronidase-2 (Hyal2) are formation of the glycocalyx and control of CD44-ERM interactions.* J Biol Chem, 2009. **284**(48): p. 33495-508.

- 47. Lepperdinger, G., J. Mullegger, and G. Kreil, *Hyal2--less active, but more versatile?* Matrix Biol, 2001. **20**(8): p. 509-14.
- 48. Stern, R., Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. Eur J Cell Biol, 2004.
 83(7): p. 317-25.
- 49. Stern, R., *Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology.* Pathol Biol (Paris), 2005. **53**(7): p. 372-82.
- 50. Feinberg, R.N. and D.C. Beebe, *Hyaluronate in vasculogenesis.* Science, 1983. **220**(4602): p. 1177-9.
- 51. Deed, R., et al., *Early-response gene signalling is induced by angiogenic* oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, highmolecular-weight hyaluronan. Int J Cancer, 1997. **71**(2): p. 251-6.
- 52. Delmage, J.M., et al., *The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid.* Ann Clin Lab Sci, 1986. **16**(4): p. 303-10.
- 53. McBride, W.H. and J.B. Bard, *Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytolysis.* J Exp Med, 1979. **149**(2): p. 507-15.
- 54. Passi, A., et al., *Hyaluronan suppresses epidermal differentiation in organotypic cultures of rat keratinocytes.* Exp Cell Res, 2004. **296**(2): p. 123-34.
- 55. Noble, P.W., et al., *Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages.* J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2368-77.
- 56. Noble, P.W., et al., *Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages.* J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 2373-8.
- 57. Noble, P.W., *Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair.* Matrix Biol, 2002. **21**(1): p. 25-9.
- 58. McKee, C.M., et al., *Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44*. J Clin Invest, 1996. **98**(10): p. 2403-13.
- 59. West, D.C., et al., *Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid.* Science, 1985. **228**(4705): p. 1324-6.
- 60. Horton, M.R., et al., *Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase by hyaluronan fragments in mouse macrophages.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(4): p. L707-15.
- 61. Rooney, P., et al., Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells. J Cell Sci, 1993. **105 (Pt 1)**: p. 213-8.
- 62. Sattar, A., et al., *Application of angiogenic oligosaccharides of hyaluronan increases* blood vessel numbers in rat skin. J Invest Dermatol, 1994. **103**(4): p. 576-9.
- 63. Slevin, M., S. Kumar, and J. Gaffney, *Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses.* J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 41046-59.
- 64. Xu, H., et al., *Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72.* J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 17308-14.
- 65. Toole, B.P., *Hyaluronan promotes the malignant phenotype.* Glycobiology, 2002. **12**(3): p. 37R-42R.
- 66. Bullard, K.M., et al., *Hyaluronan synthase-3 is upregulated in metastatic colon carcinoma cells and manipulation of expression alters matrix retention and cellular growth.* Int J Cancer, 2003. **107**(5): p. 739-46.
- Tammi, R.H., et al., *Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan*. Semin Cancer Biol, 2008.
 18(4): p. 288-95.
- 68. Kosunen, A., et al., *Reduced expression of hyaluronan is a strong indicator of poor survival in oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2004. **40**(3): p. 257-63.

- 69. Adamia, S., C.A. Maxwell, and L.M. Pilarski, *Hyaluronan and hyaluronan synthases:* potential therapeutic targets in cancer. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2005. **5**(1): p. 3-14.
- 70. Kakizaki, I., et al., *A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4methylumbelliferone*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33281-9.
- 71. Kultti, A., 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): p. 1914-23.
- 72. Rilla, K., et al., *The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor.* J Invest Dermatol, 2004. **123**(4): p. 708-14.
- 73. Kudo, D., et al., *Effect of a hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, on B16F-10 melanoma cell adhesion and locomotion.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**(4): p. 783-7.
- 74. Yoshihara, S., et al., *A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells.* FEBS Lett, 2005. **579**(12): p. 2722-6.
- 75. Urakawa, H., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo*. Int J Cancer, 2012. **130**(2): p. 454-66.
- 76. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.* J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1417-23.
- 77. Kubo, K., et al., *Depolymerization of hyaluronan by sonication*. Glycoconj J, 1993. **10**(6): p. 435-9.
- 78. Lee, H.G. and M.K. Cowman, *An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution.* Anal Biochem, 1994. **219**(2): p. 278-87.
- 79. Weston, S.A. and C.R. Parish, New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. J Immunol Methods, 1990.
 133(1): p. 87-97.
- 80. Lyons, A.B. and C.R. Parish, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994. **171**(1): p. 131-7.
- 81. Quah, B.J., H.S. Warren, and C.R. Parish, *Monitoring lymphocyte proliferation in vitro* and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. Nat Protoc, 2007. **2**(9): p. 2049-56.
- 82. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.* J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
- 83. Karvinen, S., et al., *Hyaluronan, CD44 and versican in epidermal keratinocyte tumours.* Br J Dermatol, 2003. **148**(1): p. 86-94.
- 84. Boregowda, R.K., et al., *Expression of hyaluronan in human tumor progression*. J Carcinog, 2006. **5**: p. 2.
- 85. Auvinen, P., et al., *Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival.* Am J Pathol, 2000. **156**(2): p. 529-36.
- 86. Karvinen, S., et al., *Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3.* J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 49495-504.
- 87. Nykopp, T.K., et al., *Hyaluronan synthases (HAS1-3) and hyaluronidases (HYAL1-2) in the accumulation of hyaluronan in endometrioid endometrial carcinoma.* BMC Cancer, 2010. **10**: p. 512.
- Siiskonen, H., et al., *Inverse expression of hyaluronidase 2 and hyaluronan synthases 1-3 is associated with reduced hyaluronan content in malignant cutaneous melanoma*.
 BMC Cancer, 2013. **13**: p. 181.

- Averbeck, M., et al., Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation. J Invest Dermatol, 2007. 127(3): p. 687-97.
- 90. Rauhala, L., et al., Low dose ultraviolet B irradiation increases hyaluronan synthesis in epidermal keratinocytes via sequential induction of hyaluronan synthases Has1-3 mediated by p38 and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) signaling. J Biol Chem, 2013. **288**(25): p. 17999-8012.
- 91. Frost, G.I., et al., *HYAL1LUCA-1*, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p21.3, is inactivated in head and neck squamous cell carcinomas by aberrant splicing of pre-mRNA. Oncogene, 2000. **19**(7): p. 870-7.
- 92. Lokeshwar, V.B. and M.G. Selzer, *Hyalurondiase: both a tumor promoter and suppressor.* Semin Cancer Biol, 2008. **18**(4): p. 281-7.
- 93. S1313, a Phase IB/II Randomized Study of Modified FOLFIRINOX + Pegylated Recombinant Human Hyaluronidase (PEGPH20) Versus Modified FOLFIRINOX Alone in Patients with Good Performance Status Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. Zugänglich unter: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01959139. 2015 27.07.2015.
- 94. A Phase 2, Randomized, Multicenter Study of PEGPH20 (PEGylated Recombinant Human Hyaluronidase) Combined with Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine Compared with Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine in Subjects with Stage IV Previously Untreated Pancreatic Cancer. Zugänglich unter: http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01839487. 2015 14.10.2015.
- 95. de Sa, V.K., et al., *Hyaluronidase splice variants are associated with histology and outcome in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung.* Hum Pathol, 2012. **43**(5): p. 675-83.
- 96. Shigeishi, H., et al., Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. Int J Oncol, 2009. **34**(6): p. 1565-71.
- 97. Sugahara, K.N., et al., *Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5861-8.
- 98. lijima, J., K. Konno, and N. Itano, *Inflammatory alterations of the extracellular matrix in the tumor microenvironment*. Cancers (Basel), 2011. **3**(3): p. 3189-205.
- 99. Pardue, E.L., S. Ibrahim, and A. Ramamurthi, *Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering.* Organogenesis, 2008. **4**(4): p. 203-14.
- 100. Tolg, C., et al., A RHAMM mimetic peptide blocks hyaluronan signaling and reduces inflammation and fibrogenesis in excisional skin wounds. Am J Pathol, 2012. **181**(4): p. 1250-70.
- 101. Slevin, M., et al., *Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways.* Matrix Biol, 2007. **26**(1): p. 58-68.
- Siiskonen, H., et al., Chronic UVR causes increased immunostaining of CD44 and accumulation of hyaluronan in mouse epidermis. J Histochem Cytochem, 2011. 59(10): p. 908-17.
- 103. Tobiishi, M., et al., *Changes in epidermal hyaluronan metabolism following UVB irradiation.* J Dermatol Sci, 2011. **64**(1): p. 31-8.
- 104. Arai, E., 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): p. 1839-49.
- 105. Lokeshwar, V.B., et al., *Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4methylumbelliferone in prostate cancer cells.* Cancer Res, 2010. **70**(7): p. 2613-23.
- 106. Twarock, S., et al., Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells. J Biol Chem, 2010.
 285(30): p. 23276-84.
- 107. Saito, T., et al., *4-methylumbelliferone leads to growth arrest and apoptosis in canine mammary tumor cells.* Oncol Rep, 2013. **29**(1): p. 335-42.

- Piccioni, F., et al., Antitumor effects of hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone in an orthotopic hepatocellular carcinoma model in mice. Glycobiology, 2012. 22(3): p. 400-10.
- 109. Botzki, A., et al., *L-Ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. Xray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes.* J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45990-7.
- 110. Hasova, M., et al., *Hyaluronan minimizes effects of UV irradiation on human keratinocytes.* Arch Dermatol Res, 2011. **303**(4): p. 277-84.
- 111. Mihara, M., et al., *IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions.* Clin Sci (Lond), 2012. **122**(4): p. 143-59.
- 112. Srinivas, P., et al., *Bioactive hyaluronan fragment (hexasaccharide) detects specific hexa-binding proteins in human breast and stomach cancer: possible role in tumorogenesis.* Indian J Biochem Biophys, 2012. **49**(4): p. 228-35.
- 113. Bharadwaj, A.G., et al., Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing. Am J Pathol, 2009. **174**(3): p. 1027-36.

7 Appendix

7.1 Puffer und Lösungen

7.1.1 Stains-All Stocklösung

100 mg Stains-All

100 ml Formamid

7.1.2 Stains-All Arbeitslösung

10 ml Stocklösung 10 ml Formamid 50 ml Isopropanol 1 ml 3,0 M Tris-HCl, pH 8,8 129 ml dH₂O

7.1.3 10x TAE-Puffer

400 mM Tris 50 mM CH₃COONa 9 mM Na₂EDTA pH 7,9

7.1.4 Farbmarkierung für die Lauffront

2 ml dH₂O

30 % Glycerin (Sigma, Steinheim)

2 mg Bromphenol-Blau (Sigma, Steinheim)

7.1.5 Elutionspuffer

0,1 M Tris

0,1 M Na-Acetat

0,025 % (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat) (CHAPS)

7.1.6 Quellpuffer

0,1 M Tris

0,1 m Na-Acetat

0,02 % NaN₃

pH 7,3 (mit Essigsäure anpassen)

7.1.7 Laufpuffer für die Größenausschlusschromatographie

- 0,5 M Acetat
- 0,02 % NaN₃

0,025 CHAPS

7.1.8 Pronase-Puffer

100 mmol/l Tris-HCl, pH 8,1

1 mmol/l CaCl₂

1500 U/ml Heparin

7.1.9 PBS

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- **1,5 mM KH**₂**PO**₄
- 8,3 mM Na₂HPO₄ pH 7,4

7.1.10 Annexin V Binde-Puffer

- 0,1 M Hepes pH 7,4
- 1,4 M NaCl

25 mM CaCl₂

7.1.11 TBS/T

100 mM Tris HCl pH 7,4

1,5 mM NaCl

0,1 % Tween®

7.1.12 2x Lämmli

150 mM Tris-base pH 7

20 % Glycerol

4 % SDS

8 % β-Mercaptoethanol

7.1.13 Laufpuffer für SDS-PAGE

250 mM Tris

1,9 mM Glycin

0,1 % SDS

7.1.14 Transferpuffer für Western Blot

1x Laufpuffer

20 % Methanol

0,01 % SDS

7.2 Primer

Gen	Primer-Sequenz
hHAS1 realtime	f 5'-TACAACCAGAAGTTCCTGGG-3'
	r 5'-CTGGAGGTGTACTTGGTAGC-3'
hHAS2 realtime	f 5'-GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA-3'
	r 5'-TCCAACCATGGGATCTTCTT-3'
RT hHAS3v1	f 5'-GAGATGTCCAGATCCTCAACAA-3'
	r 5'-CCCACTAATACACTGCACAC-3'
hHAS3v2 realtime	f 5'-ATTCGGTGGACTACATCCAG-3'
	r 5'-CTACTGCCATACCTTTCCCT-3'
hHyal1-realtime	f 5'-CCAAGGAATCATGTCAGGCCATCAA-3'
	r 5'-CCCACTGGTCACGTTCAGG-3'
hHyal2-realtime	f 5'-GGCTTAGTGAGATGGACCTC-3'
	r 5'-CCGTGTCAGGTAATCTTTGAG-3'
RT hHyal2 2.0	f 5'-CTTCACACGACCCACCTACA-3'
	r 5'-CGCCAATGGTAGAGATGAGG-3'
hCD44 pan RT	f 5'-GCTATTGAAAGCCTTGCAGAG-3'
	r 5'-CGCAGATCGATTTGAATATAACC-3'
hRHAMM	f 5'-GAATTTGAGAATTCTAAGCTTG-3'
	r 5'-CCATCATACCCCTCATCTTTGTT-3'
hGAPDH realtime	f 5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'
	r 5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'
RT 18S 2.0	f 5'-GCAATTATTCCCCATGAACG-3'
	r 5'-GGCCTCACTAAACCATCCAA-3'

8 Kongressbeiträge und Preise

8.1 Kongressbeiträge

Röck K, <u>Kellner MB</u>, Hippe A, Homey B, Fischer JW. *Development of squamous skin carcinomas is supported by hyaluronan*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2012; **3** (Suppl 1): S76 (331)

8.2 Preise

Bestes Sessionposter Onkologie

Hyaluronan unterstützt die Entwicklung dermaler Plattenepithelkarzinome Doktorandenkongress 2012 der Medical Research School Düsseldorf
Danksagung

9 Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die große Unterstützung des Promotionsvorhabens.

Weiterhin möchte ich mich gerne bei unseren Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Homey aus der Hautklinik bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. Andreas Hippe und Herrn Dr. Erich Bünemann.

Frau Dr. Katharina Gorges (ehem. Röck) als meiner Betreuerin danke ich ganz besonders für ihre Geduld, die praktische und theoretische Anleitung sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Dr. Sören Twarock sei herzlich für seine umfassende Problemlösungskompetenz und außerordentliche Hilfsbereitschaft gedankt.

Frau Prof. Dr. Maria Grandoch und Frau Dr. Kathrin Feldmann waren sehr hilfreich in allen Belangen der Durchflusszytometrie, dafür ein besonderer Dank.

Für die unkomplizierte Administration gebührt mein Dank Frau Erika Lohmann und Frau Karin Montag. Unseren technischen Assistentinnen sei für das Teilen ihrer wertvollen praktischen Erfahrung gedankt, namentlich Frau Beate Weyrauther, Frau Annika Zimmermann, Frau Irmhild Rüter, Frau Kerstin Freidel und Frau Bärbel Räupert.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich herzlich für eine schöne und kollegiale Zeit, viele interessante Einblicke in unterschiedlichste Forschungsthemen und große und kleine Hilfestellungen im Alltag als medizinischer Doktorand.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für die stetige Unterstützung sowie den beratenden Beistand.