

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. W. Fischer

**Brustkrebszellen modulieren die Hyaluronsäure-Matrix
von mesenchymalen Stammzellen und erzeugen ein
pro-metastatisches Milieu**

Dissertation

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

vorgelegt von

Jessica Romy Wladarz

2023

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

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Zweitgutachter: PD Dr. med. Natalia Krawczyk

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau und die Tumorentität, die bei Frauen am häufigsten zum Tode führt. Ein Hauptgrund liegt in der Entwicklung von Metastasen, die bei einem Mammakarzinom vorwiegend in Knochen, Lunge, Leber und Hirn vorkommen können. Der Metastasierungsprozess unterliegt diversen Regulationsmechanismen, die bis dato nicht vollends verstanden wurden. Eine entscheidende Rolle spielt das Mikromilieu des Primarius sowie des entfernten Organs. Nach der „seed and soil“ - Hypothese ist die Metastasierung kein zufälliger Prozess, sondern unterliegt einem Organotropismus. Dabei hängt die Einwanderung von Tumorzellen in die prämetastatische Nische maßgeblich von Veränderungen der extrazellulären Matrix ab. Mesenchymale Stammzellen sind multipotente Progenitorzellen im Knochenmark und als Modulatoren der extrazellulären Matrix Teil der prämetastatischen Nische. Hyaluronsäure ist ein Glykosaminoglykan und Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Es wird zwischen der hochmolekularen und fragmentierten Hyaluronsäure differenziert, da sie unterschiedliche biologische Funktionen haben. Hochmolekulare Hyaluronsäure fördert die Proliferation sowie Migration von Zellen und kann so zu einer Progression von Tumoren führen. Fragmentierte Hyaluronsäure steigert die Motilität von Zellen und fördert die Angiogenese sowie Invasion von Tumorzellen.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Modulation der Hyaluronsäure-Matrix von mesenchymalen Stammzellen durch Mammakarzinomzellen *in vitro* zu untersuchen. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Hyaluronsäure auf die Migration und Motilität von Mammakarzinomzellen analysiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen eine ausgeprägte Hyaluronsäure-Matrix aufweisen. Die Proliferation mesenchymaler Stammzellen wird durch lösliche Faktoren von Mammakarzinomzellen gefördert und ihre Hyaluronsäure Synthese hochreguliert. Eine Hemmung der Hyaluronsäure-Synthese verstärkt die adipogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen. Die Migration von Mammakarzinomzellen wird durch lösliche Faktoren modifizierter mesenchymaler Stammzellen gesteigert. Außerdem erhöht Hyaluronsäure die Motilität von Mammakarzinomzellen. Zusammenfassend entsteht durch die Modulation der Hyaluronsäure-Matrix mesenchymaler Stammzellen ein pro-metastatisches Milieu, das die Migration von Mammakarzinomzellen fördert. Aufbauend auf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mammakarzinomzellen einen hemmenden Effekt auf die adipogene

Differenzierung mesenchymaler Stammzellen haben. Hyaluronsäure scheint in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen, so dass die Hyaluronsäure-Matrix mesenchymaler Stammzellen möglicherweise ein Angriffspunkt in der Tumorthherapie darstellen könnte.

Summary

Breast cancer is the most common cancer type in women and one of the leading causes for cancer death. The main reason for this is the development of metastases, which commonly occur in bone, lung, liver and brain. Metastatic processes underlie certain regulatory mechanisms, that are not fully understood yet. The microenvironment of the primary tumor, but also secondary pathomechanisms play a crucial role. According to the “*seed and soil*” hypothesis, metastasis is subject to organotropism and is not a random process. Homing and survival of cancer cells in the metastatic niche depend on a supporting microenvironment. Mesenchymal stem cells are multipotent progenitor cells in the bone marrow and potent modulators of the microenvironment, also in the premetastatic niche. Hyaluronan is a glycosaminoglycan and a major component of the extracellular matrix. High molecular weight and fragmented hyaluronan have different biological functions. High molecular weight hyaluronan supports the proliferation and migration of cells, thus leading to cancer progression. Fragmented hyaluronan has been shown to increase motility of cells, promote angiogenesis and invasion of tumor cells. Aim of the present study was to investigate the modulation of the hyaluronan matrix of mesenchymal stem cell by breast cancer cells and its effect on migration and motility *in vitro*. Investigation of the hyaluronan-associated system revealed that mesenchymal stem cells have a pronounced pericellular hyaluronan matrix. Soluble factors of breast cancer cells enhanced the proliferation and hyaluronan synthesis of mesenchymal stem cells. It was shown that the inhibition of hyaluronan synthesis promotes adipogenic differentiation in mesenchymal stem cells. Furthermore, soluble factors of tumor-activated mesenchymal stem cells improved migration of breast cancer cells, while hyaluronan increased their motility. The results support our hypothesis that the modulation of the hyaluronan matrix of mesenchymal stem cells leads to a pro-metastatic environment that promotes migration of breast cancer cells. Based on these results it was shown that breast cancer cells inhibit the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a hyaluronan-dependent manner. Possibly, the hyaluronan matrix of mesenchymal stem cells could be a new target for cancer therapy.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation.....	1
1.1.2 Metastasierung.....	2
1.1.3 Die Rolle der prämetastatischen Nische während der Tumorprogression.....	3
1.2 Mesenchymale Stammzellen.....	3
1.2.1 Charakteristika und Stammzeleigenschaften.....	3
1.2.2 Tumorassoziierte MSC.....	4
1.3 Hyaluronsäure.....	6
1.3.1 Das Hyaluronsäure-System und dessen Komponenten.....	6
1.3.2 Hyaluronsäure und Tumorprogression.....	7
1.4 Ziele der Arbeit.....	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Materialien.....	9
2.1.1 Zelllinien.....	9
2.1.2 Zellkultur.....	9
2.1.3 Stimulantien und Inhibitoren.....	10
2.1.4 Primer.....	10
2.1.5 Geräte.....	10
2.2 Zellkultur.....	11
2.2.1 Kultivierung der Mammakarzinomzellen.....	11
2.2.2 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen.....	11
2.2.3 Differenzierung der Mesenchymalen Stammzellen.....	11
2.2.3.1 Osteogene Differenzierung.....	11
2.2.3.2 Adipogene Differenzierung.....	12

2.2.4	Generierung von Überstand.....	13
2.2.5	Proliferation von MSC nach Stimulation mit Hyaluronsäure.....	13
2.2.6	Proliferation von MSC nach Stimulation mit Überstand.....	13
2.2.7	Scratch-Assay.....	13
2.2.8	Transwell Migrations Assay.....	14
2.2.9	Zeitraffer Mikroskopie und Tracking von Zellen.....	14
2.3	Färbungen.....	15
2.3.1	Hyaluronsäure Färbung (Affinitätszytochemie von HA).....	15
2.3.2	Immunzytochemische Färbung CD44.....	15
2.3.3	Alizarin-Rot Färbung.....	15
2.3.4	Oil Red O Färbung.....	16
2.4	Methoden.....	16
2.4.1	HABP-Immunaффinitäts-Assay.....	16
2.4.2	Semiquantitative mRNA Expressionsanalyse.....	16
2.4.2.1	RNA Isolation.....	16
2.4.2.2	RNA Quantifizierung.....	17
2.4.2.3	cDNA Synthese.....	17
2.4.2.4	Quantitative Real-Time PCR.....	17
2.5	Statistik.....	18
3	Ergebnisse.....	19
3.1	Charakterisierung der HA Matrix mesenchymaler Stammzellen.....	19
3.1.1	Relative Expression der HA-Synthasen, HA-degradierenden Enzyme und Rezeptoren.....	19
3.1.2	Affinitätszytochemische Färbung von Hyaluronsäure.....	19
3.1.3	Immunzytochemische Färbung von CD44.....	20
3.2	Proliferation von MSC nach Stimulation mit Hyaluronsäure.....	20
3.3	HABP-Immunaффinitätsassay von MSC nach Behandlung mit 4MU.....	21
3.4	Einfluss von Tumorüberstand auf die Proliferation und Hyaluronsäure- Gehalt im Medium von MSC.....	22
3.4.1	Proliferation von MSC nach Stimulation mit Überstand.....	22
3.4.2	HABP-Immunaффinitätsassay von MSC nach Stimulation mit Überstand und 4-MU.....	23
3.4.3	Affinitätszytochemie von Hyaluronsäure mesenchymaler Stammzellen nach Stimulation mit Überstand.....	23

3.5	Differenzierung von MSC.....	24
3.5.1	adipogene und osteogene Differenzierung.....	24
3.5.2	Inhibition der HA-Synthese fördert die adipogene Differenzierung.....	25
3.6	Einfluss von MSC und HA auf die Motilität und Migration von Mammakarzinomzellen.....	26
3.6.1	Scratch Assay von MCF-7 und MDA-MB-231 nach Stimulation mit Überstand von MSC.....	27
3.6.2	Transwell Migrations Assay von MCF-7 und MDA-MB-231 nach Stimulation mit Überstand von MSC.....	27
3.6.3	HA steigert die Motilität von Mammakarzinomzellen in der Zeitraffer Mikroskopie.....	30
4	Diskussion.....	31
4.1	HA-Matrix mesenchymaler Stammzellen.....	31
4.2	Einfluss von löslichen Faktoren von Mammakarzinomzellen auf die HA-Matrix und Proliferation von MSC.....	32
4.3	Einfluss von HA auf die adipogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.....	32
4.4	Einfluss von MSC und HA auf die Motilität und Migration von Mammakarzinomzellen.....	34
5	Schlussfolgerung.....	37
6	Literaturverzeichnis.....	39

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Expression der HA-assoziierten Enzyme und Rezeptoren in MSC
- Abb. 2: MSC haben eine ausgeprägte HA-Matrix
- Abb. 3: MSC exprimieren CD44
- Abb. 4: Externe HA hat keinen Einfluss auf die Proliferation von MSC
- Abb. 5: 4-MU hemmt die HA-Synthese von MSC
- Abb. 6: Lösliche Faktoren von Brustkrebszellen steigern die Proliferation von MSC
- Abb. 7: Der Überstand von MCF-7 induziert die HA-Synthese in MSC, dieser Effekt kann durch 4MU inhibiert werden
- Abb. 8: Brustkrebszellen modulieren die HA-Matrix von MSC
- Abb. 9: Nachweis der Multipotenz der verwendeten MSC anhand ihres Potentials zu adipogener und osteogener Differenzierung
- Abb. 10: 4-MU steigert die adipogene Differenzierung von MSC
- Abb. 11: Der Überstand von MSC, die mit Tumorüberstand stimuliert wurden, erhöht die Migration von Brustkrebszellen, 4-MU revertiert diesen Effekt
- Abb. 12: Versuchsaufbau des Transwell Migrations-Assays
- Abb. 13: Mit Tumorüberstand stimulierte MSC steigern die Migration von Brustkrebszellen und fördern die Bildung von Tumorkolonien
- Abb. 14: Die Motilität von Brustkrebszellen wird durch F HA und HMW HA gesteigert
- Abb. 15: Schlussfolgerung: Brustkrebszellen modulieren die HA-Matrix von MSC und führen zu einem pro-metastatischen Milieu

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die verwendeten Zelllinien
Tabelle 2:	Übersicht über die in der Zellkultur verwendeten Substanzen
Tabelle 3:	Übersicht über die verwendeten Stimulantien und Inhibitoren
Tabelle 4:	Übersicht über die verwendeten Primer
Tabelle 5:	Übersicht über die verwendeten Geräte
Tabelle 6:	Herstellung von 10 ml osteogenem Differenzierungsmedium
Tabelle 7:	Herstellung von 10 ml adipogenem Differenzierungsmedium

Abkürzungsverzeichnis

4MU	4-Methylumbelliferon
α -SMA	Alpha-Aktin-2
BSA	Bovines Serumalbumin
BCC	Brust- bzw. Mammakarzinomzellen (<i>breast cancer cells</i>)
CAF	karzinom-assoziierte Fibroblasten
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSC	Karzinom-Stammzellen (<i>cancer stem cells</i>)
CTC	zirkulierende Tumorzellen (<i>ciculating tumor cells</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	disseminierte Tumorzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ER	Östrogenrezeptor
EZM	Extrazelluläre Matrix
F HA	fragmentierte Hyaluronsäure
FKS	Fötales Kälberserum
FSP1	Fibroblasten-spezifisches Protein 1 (<i>fibroblast-specific protein 1</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HA	Hyaluronsäure
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptors 2
HIF-1	Hypoxie-induzierten Faktor 1
HM HA	hochmolekulare Hyaluronsäure
HR	Hormonrezeptor
Hyal	Hyaluronidase

IU	Internationale Einheiten
kDa	Kilodalton
M	Mol
MDa	Megadalton
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7 Cells</i>
MDA-MB-231	<i>MD Anderson-Metastatic Breast-231 Cells</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
MSC	Mesenchymale Stammzellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PMN	prämetastatische Nische
PR	Progesteronrezeptor
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
rcf	Zentrifugalbeschleunigung (<i>relative centrifugal force</i>)
RHAMM	Hyaluronan-mediated motility receptor
RNA	Ribonukleinsäure
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
TA-MSC	tumor-assoziierte MSC
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor beta
TME	<i>tumor (supporting) microenvironment</i>
TNBC	triple negativer Brustkrebs
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF-A	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A
VEGFR-1	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 1
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
μ M	Mikrometer
$^{\circ}$ C	Grad Celcius

1 Einleitung

1.1 Brustkrebs

1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung, die bei Frauen diagnostiziert wird. Für das Jahr 2020 wurden weltweit über 2 Millionen neue Fälle registriert. Durch eine optimierte Krebsvorsorge und Registrierung ist die Inzidenz in den letzten Dekaden kontinuierlich gestiegen. Die Verwestlichung des Lebensstils vieler Entwicklungsländer trägt dazu bei, dass ein weiterer Anstieg der Inzidenz erwartet wird. Das Mammakarzinom ist darüber hinaus die Tumorentität, die bei Frauen am häufigsten zum Tode führt [1]. Einer der Hauptgründe dafür ist die Entwicklung von Metastasen. Diese kommen vorwiegend in Knochen, Leber, Lunge und Gehirn vor [2]. Das weibliche Geschlecht stellt einen nicht modifizierbaren Risikofaktor für Brustkrebs dar. Weniger als ein Prozent aller Brustkrebspatienten sind Männer. Bei Diagnosestellung sind achtzig Prozent der Patient:innen über fünfzig Jahre alt. Das Alter zählt zu den biographischen Risikofaktoren, ebenso genetische Mutationen wie die Mutation im BRCA1- bzw. BRCA2-Gen, die Familienanamnese und hormonelle Faktoren bedingt durch Menarche, Schwangerschaft und Menopause. Zu den modifizierbaren Risikofaktoren gehören ein erhöhter BMI ($>25 \text{ kg/m}^2$), Alkoholkonsum, Nikotinabusus und eine fettreiche Ernährung mit hohem Fleischkonsum. Das Überleben der Patient:innen ist abhängig von dem Stadium sowie dem molekularen Subtyp des Tumors. Für die Identifizierung der vier Subtypen und die konsequente Therapie ist der Hormonrezeptor (HR)-Status von großer Bedeutung. Hierbei wird die Expression des Östrogen-Rezeptors (ER), des Progesteron-Rezeptors (PR), sowie des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (HER2) im Tumorgewebe untersucht. Es wird der Luminal-A-, Luminal-B-, und HER2-Subtyp sowie der triple-negative Brustkrebs (TNBC) unterschieden. Bei TNBC wird keiner der oben genannten Rezeptoren exprimiert [1]. Dieser Subtyp ist häufig mit einer Mutation im BRCA1-Gen sowie einem erhöhten Metastasierungs- und Rezidivrisiko vergesellschaftet. Erwähnenswert ist der M-Subtyp des TNBC, da dieser durch tumorinfiltrierende Lymphozyten und tumor-assoziierte mesenchymale Stammzellen (TA-MSC) charakterisiert wird [3].

1.1.2 Metastasierung

Unter Metastasierung versteht man die Ausbildung eines räumlich getrennten, sekundären Tumors aus Zellen des Primärtumors. Der Erfolg dieses hochkomplexen Prozesses ist abhängig von einer Kaskade bestimmter molekularer Ereignisse. Die einzelnen Signalkaskaden und Regulationsmechanismen sind bis heute nicht vollends verstanden und deshalb Gegenstand aktueller Forschung. Der erste Schritt für die Bildung von Metastasen ist die Induktion der Angiogenese im Primärtumor. Die wachstumsbedingte Hypoxie im Primärtumor induziert durch Hypoxie-induzierten Faktor 1 (HIF-1) eine Aktivierung von Genen, die Angiogenese, Motilität und Resistenz gegen Apoptose fördern. Außerdem wird die Proliferation von Endothelzellen stimuliert. Durch Degradierung des umliegenden Stromas wird die Migration der Endothelzellen ermöglicht, so dass neue Gefäße formiert werden. Diese Gefäße sind durch eine erhöhte Permeabilität gekennzeichnet und erleichtern den Eintritt von Tumorzellen in die systemische Zirkulation. Für den Eintritt in die systemische Zirkulation lösen Tumorzellen via epithelial-mesenchymaler-Transition (EMT) ihren Zell-Zell-Kontakt und erhalten einen mesenchymalen Phänotyp, der mit einer erhöhten Invasivität vergesellschaftet ist. So konnte gezeigt werden, dass die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin in Brustkrebszellen mit einem kürzeren postoperativen Überleben von Patienten einhergeht [4]. Die Interaktion zirkulierender Tumorzellen (CTC) mit Thrombozyten, die eine schützende Hülle formieren, verhindert die Detektion durch das Immunsystem und schwächt den physikalischen Stress im Gefäßsystem ab. Da nicht alle CTC feinste Kapillaren passieren können, führt die Unterbrechung der Zirkulation schließlich zu einer Extravasation der Tumorzellen. Diese werden folglich disseminierte Tumorzellen (DTC) genannt. Vor allem Organe, wie die Leber und der Knochen, die permeable Sinusoide aufweisen, erleichtern die Extravasation.

In der Regel überleben und proliferieren bestimmte Zelltypen nur in einer spezifischen Mikroumgebung. DTC sind jedoch in der Lage, in Organen mit unterschiedlicher extrazellulärer Matrix (EZM) Metastasen zu bilden. Diese Region in der EZM wird metastatische Nische bezeichnet. Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits vor Invasion von Tumorzellen Veränderungen in der EZM nachzuweisen sind. Diese Veränderungen werden durch den Begriff der „prämetastatischen Nische“ (PMN) beschrieben und in Abschnitt 1.1.3 näher ausgeführt [5, 6].

1.1.3 Die Rolle der prämetastatischen Nische während der Tumorprogression

Die „*seed and soil*“ - Hypothese wurde bereits 1889 von Paget aufgestellt [7]. Er beobachtete, dass Metastasierung nicht dem Zufall, sondern dem Organotropismus der „Saat“ (der CTC) zu einem bestimmten „Nährboden“ (Organ der zukünftigen Metastase) unterliegt. Sowohl klinische Beobachtungsstudien, als auch tierexperimentelle Studien bestätigten, dass Tumorzellen in spezifische Organe metastasieren. Die intramuskuläre Injektion von Melanomzellen in Mäusen führte zu einer Ausbildung von Lungenmetastasen, während eine Injektion direkt ins Nierengewebe keine Bildung von Metastasen zur Folge hatte. Bemerkenswerterweise führte die Anlage eines peritoneovenösen Shunts bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom nicht häufiger zu einer extraperitonealen Metastasierung [8]. Kaplan et al. konnten zeigen, dass die Ausbildung einer PMN ein wichtiger, vorausgehender Schritt für die Bildung von Metastasen ist. VEGFR-1 (*vascular endothelial growth factor receptor 1*) positive, aus dem Knochenmark stammende Zellen, siedelten sich bereits vor Ankunft der Tumorzellen in der PMN ab [9]. Die Tumorzellen benötigen folglich eine bestimmte Mikroumgebung mit Nährstoffen, veränderter EZM und Signale durch Stromazellen für ihre Extravasation und Kolonisation. Liu et al. beschreiben die Abfolge der Bildung einer PMN [10]. Der erste Schritt wird als *priming* Phase bezeichnet. Diese Phase bedingt Veränderungen der EZM und die Modulierung von Stromazellen durch lösliche Faktoren des Primärtumors. Daraufhin folgt die *licensing* Phase, in der Knochenmarkszellen, sowie Immunzellen rekrutiert werden. Schließlich wird durch die *initiation* Phase die Extravasation und Adhäsion von CTC durch modulierte Stromazellen gefördert. Fortan wird die PMN als metastatische Nische bezeichnet [11].

1.2 Mesenchymale Stammzellen

1.2.1 Charakteristika und Stammzeleigenschaften

Mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden bereits 1974 durch A. Friedenstein beschrieben [12]. Er identifizierte die aus dem Knochenmark isolierte Zellpopulation als multipotente stromale Vorläuferzellen und bezeichnete sie als *colony-forming unit fibroblasts* (CFU-Fs). Aufgrund ihres Stammzellcharakters und Differenzierungspotentials wurden sie von A. Caplan als MSC bezeichnet [13]. Zum Zeitpunkt jetziger Forschung können sie aus verschiedenen Geweben gewonnen werden [14]. Um die Heterogenität der isolierten MSC einzugrenzen, hat die *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) 2005 Kriterien für die Identifikation von MSC vorgeschlagen [15]. MSC

sollten aus Geweben wie Fett, dem Knochenmark oder der Nabelschnur stammen, in der Zellkultur adhärent sein und das Potential zur Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten haben. Außerdem sollten die hämatopoetischen Zelloberflächenmarker CD45, CD34 und CD14 nicht exprimiert werden, während Zelloberflächenmarker wie CD105, CD73, CD44, CD90 und CD71 von MSC exprimiert werden sollten [16].

Die Proliferation, Differenzierung und Funktion mesenchymaler Stammzellen ist abhängig von der umgebenden EZM, den umgebenden Zellen und deren löslichen Faktoren. Dennoch haben MSC selbst einen entscheidenden Einfluss auf Umbauprozesse der EZM, Zellproliferation und die Immunantwort des Körpers. Ein wichtiges klinisches Beispiel hierfür ist die Wundheilung.

Durch ihren Stammzellcharakter besitzen MSC die Fähigkeit, in andere Gewebe zu migrieren. Durch den Umbau der EZM können sie diese mesenchymalen Eigenschaften via EMT auch in Epithelzellen induzieren. Durch einen mesenchymalen Phänotyp erlangen Epithelzellen die Möglichkeit sich von benachbarten Zellen zu lösen und in umgebendes Gewebe zu migrieren. Außerdem wird die Resistenz gegen Apoptose erhöht. Im Knochenmark spielen MSC eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Regulation der hämatopoetischen Stammzellnische. Zudem haben MSC immunmodulatorische Effekte auf verschiedene Zellpopulationen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Sie beeinflussen die antigenpräsentierende Funktion von dendritischen Zellen und reduzieren damit ihre inflammatorischen Eigenschaften. Des Weiteren hemmen MSC die Proliferation von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und die Ausschüttung von Interferon γ . Durch die MSC-induzierte Produktion von IL-10 wird die Entstehung von regulatorischen T-Zellen getriggert. Regulatorische T-Zellen supprimieren die Aktivierung des Immunsystems und regulieren somit dessen Selbsttoleranz. Nicht zuletzt aufgrund ihres immunsuppressiven Potentials sind MSC Gegenstand aktueller Forschung für die Zelltherapie im Rahmen von Autoimmunerkrankungen. Jedoch scheint ihr immunmodulatorisches Potential auch in der Tumorentstehung und Metastasierung eine wichtige Rolle zu spielen [14, 17].

1.2.2 Tumorassoziierte MSC

MSC sind an der Initiation, Progression, sowie Metastasierung von Tumoren beteiligt. Für Tumorzellen sind ihre immunsuppressiven Eigenschaften hinsichtlich ihres Überlebens, der Proliferation sowie des Erlangens von Resistenzmechanismen benefiziell. Tumore werden häufig als „Wunden, die niemals heilen“ bezeichnet. Die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen führt zu einer

Rekrutierung von MSC und Zellen des Immunsystems in den Primärtumor. Lösliche Faktoren des Tumors bedingen eine Aktivierung der MSC und eine Differenzierung in Tumor-assoziierte MSC (TA-MSC) bzw. Karzinom-assoziierte Fibroblasten (CAF), sowie Adipozyten [11, 18, 19]. Ähnlich den MSC nehmen TA-MSC Einfluss auf Zellen des Immunsystems. In Makrophagen induzieren sie einen antiinflammatorischen Phänotyp. M2-Makrophagen unterstützen demnach Umbauprozesse der EZM und fördern die Angiogenese [20]. CAF haben die Morphologie eines Myofibroblasten. Sie exprimieren alpha Actin-2 (α -SMA), FSP1 (*fibroblast-specific protein 1*), sowie SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*). Genauso wie TA-MSC zeigen sie eine gesteigerte Proliferation und produzieren Proteine der EZM. Die Hypothese, dass MSC in CAF differenzieren, konnte durch *in vivo* und *in vitro* Studien wie von Mishra et al. bestärkt werden [21]. In dieser Studie wurden MSC für 30 Tage mit konditioniertem Medium von Brustkrebszellen kultiviert. Die MSC wiesen nach 30 Tagen eine erhöhte Expression von CAF-Markern auf und es konnte eine verstärkte Tumorpherifation beobachtet werden. TA-MSC können die lokale EZM durch die Sekretion von Metalloproteinasen degradieren. Durch Produktion von TGF- β und direkten Zell-Zell-Kontakt induzieren sie in Tumorzellen EMT. Bereits diese Veränderungen im Primärtumor erleichtern die Migration und Invasion in das umgebende Stroma [22]. Durch die TA-MSC induzierte EMT erlangen die Tumorzellen nicht nur einen invasiveren Phänotyp, sondern auch Stammzelleigenschaften wie Selbsterneuerung und Differenzierung. Es wird angenommen, dass so entstandene *cancer stem cells* (CSC) unter anderem durch ihre Resistenz gegen Chemo- und Radiotherapie bei der Entstehung von Tumorrezidiven und Metastasen von Bedeutung sind [23]. Während der Metastasierung werden MSC bereits vor den Tumorzellen in die PMN rekrutiert. Dabei werden sie durch chemotaktische Zytokine wie TNF- α , TGF- β und VEGF-A an den Ort der vermeintlichen inflammatorischen Reaktion gelockt. Eine Akkumulation von Fibronectin erleichtert ihre Adhäsion. In der PMN sind MSC maßgeblich an den Umbauprozessen der EZM beteiligt. Die verstärkte Expression von Matrix-Metalloproteinasen vereinfacht die Invasion, während die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren sowie Chemokinen die Adhäsion von Tumorzellen fördert. In der Literatur wird angenommen, dass MSC in die PMN rekrutiert werden, um ein ideales Milieu zu schaffen, das die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen begünstigt, unter anderem durch die fehlende Detektion durch das Immunsystem. Zusammenfassend erhöhen TA-MSC das metastatische Potential von Tumorzellen durch eine Förderung ihrer Motilität und Invasivität sowie durch die Formierung einer PMN. Dabei spielen vor allem ihre immunsuppressiven Eigenschaften und die Fähigkeit des *EZM-Remodeling* eine entscheidende Rolle [22, 24, 25].

1.3 Hyaluronsäure

1.3.1 Das Hyaluronsäure-System und dessen Komponenten

Hyaluronsäure (HA) gehört zu den Glykosaminoglykanen und ist ein Hauptbestandteil der EZM. Als nicht sulfatiertes, lineares Glykosaminoglykan besteht HA aus alternierenden Einheiten D-Glukuronsäure und D-N-Acetylglukosamin. HA wird von drei Isoformen der membranständigen Hyaluronsäure-Synthase (HAS 1, HAS2 und HAS3) produziert und aufgrund ihrer Größe sowie wasserbindenden Eigenschaften sofort in den extrazellulären Raum extrudiert. Der Abbau erfolgt durch verschiedene Isoformen der Hyaluronidasen (HYAL). Die wichtigsten Isoformen sind die lysosomale HYAL1, die HA zu Oligosacchariden und Disacchariden abbaut, und die GPI-verankerte HYAL2. Gemeinsam mit CD44, einem HA-Rezeptor, bindet HYAL2 HA und degradiert diese zu 20 kDa Fragmenten, welche schließlich in Lysosomen transferiert werden.

Durch die negative Ladung hat HA eine hohe Wasserbindungskapazität und fördert die viskoelastischen Eigenschaften von Geweben. Außerdem kann HA als perizelluläre Matrix dienen, die nicht nur eine Barriere darstellt, sondern durch die Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die Zellproliferation, Adhäsion und Migration regulieren. Für die biologische Funktion sind die Saccharid-Kettenlänge, das Molekulargewicht, sowie der Interaktionspartner von Bedeutung [26]. Die Hochmolekulare HA (HM HA) (> 1 MDa) spielt eine wesentliche Rolle bei der Wundheilung und hat antiinflammatorische, sowie antifibrotische Effekte, während die HA Fragmente (F HA) (< 500 kDa) Inflammation, Angiogenese und Zellmigration vermitteln [27, 28]. Zu den Interaktionspartnern der HA gehören unter anderem die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM. CD44 agiert als multifunktionaler, transmembranärer Rezeptor mit Zellen sowie der EZM und spielt eine wichtige Rolle bei der Progression von Tumoren. RHAMM vermittelt Zellmotilität und ermöglicht durch Interaktion mit CD44 die Verstärkung der CD44-vermittelten Signalwege [29, 30].

1.3.2 Hyaluronsäure und Tumorprogression

Veränderungen im HA-Metabolismus können die Progression von Tumoren fördern. Durch vermehrte HA-Akkumulation im Stroma entsteht ein Mikromilieu, das die Tumorprogression unterstützt, das sogenannte *tumor (supporting) microenvironment* (TME). In vielen Tumorentitäten, darunter auch das Mammakarzinom, ist eine erhöhte Produktion von HA mit Invasivität, schlechter Prognose und schlechterem Überleben assoziiert. So spielt HA eine zentrale Rolle bei der Zellproliferation, -migration, und -invasion, sowie bei der Angiogenese und der Immunevasion von Tumoren. Durch den HA-Rezeptor CD44 wird die zelluläre Aufnahme von HA und deren Degradation bestimmt. Für die Progression von Tumoren ist das Molekulargewicht der HA ein wichtiger Faktor. HMW-HA bildet eine perizelluläre Matrix und begünstigt durch Hydratation der EZM die Zellproliferation, sowie Migration stromaler Zellen. Die Akkumulation von F HA ist mit Tumorinvasivität assoziiert und induziert durch einen Umbau des TME Angiogenese. Außerdem fördert F HA durch Induktion von inflammatorischen Prozessen die Migration von Stromazellen.

Bedeutende Interaktionspartner der HA sind RHAMM und CD44. Eine erhöhte Expression von RHAMM in Mammakarzinomzellen ist mit mehr Metastasierung und schlechtem Outcome von Patienten assoziiert. In Verbindung mit CD44 werden Signalkaskaden aktiviert, die die Progression und Motilität der Tumorzellen fördern. HA wird hierbei nicht nur von Tumorzellen selbst, sondern maßgeblich durch Zellen im Stroma wie MSC gebildet [26, 28].

1.4 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Interaktion zwischen mesenchymalen Stammzellen und Mammakarzinomzellen *in vitro* untersucht werden. Mesenchymale Stammzellen spielen eine bedeutende Rolle während des Umbaus der extrazellulären Matrix in der prämetastatischen Nische. Hyaluronsäure ist ein elementarer Bestandteil der extrazellulären Matrix und kann die Tumorprogression fördern. Deshalb soll ein besonderer Fokus auf den Stellenwert der Hyaluronsäure während der Interaktion von mesenchymalen Stammzellen und Mammakarzinomzellen gelegt werden, um mögliche Hemmmechanismen dieser Interaktion zu identifizieren.

Ziele dieser Arbeit sind:

1. Die Charakterisierung der Hyaluronsäure-Matrix von mesenchymalen Stammzellen *in vitro*
2. Die Untersuchung des Einflusses löslicher Faktoren von Mammakarzinomzellen auf die Hyaluronsäure-Matrix mesenchymaler Stammzellen *in vitro*
3. Die Analyse der Auswirkungen von Hyaluronsäure und mesenchymaler Stammzellen auf die Motilität und Migration von Mammakarzinomzellen *in vitro*

Die Identifizierung von Hyaluronsäure als Bindeglied der Interaktion von mesenchymalen Stammzellen und Mammakarzinomzellen könnte die Entdeckung neuer Hemmmechanismen voranbringen, um die Bildung einer prämetastatischen Nische und damit die Tumorprogression zu beeinflussen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Abkürzung	Bezeichnung	Kultivierungsmedium	Lieferant
MCF-7	Humane epitheliale Mammakarzinomzellen	DMEM + 4,5 g/l Glucose + 10 % FKS + 100 U/ml Penicillin- Streptomycin	CLS, Eppenheim
MDA-MB-231	Humane, mesenchymale Mamma-Adenokarzinomzellen	DMEM + 4,5 g/l Glucose + 10 % FKS + 100 U/ml Penicillin- Streptomycin	CLS, Eppenheim
MSC	Mesenchymale Stammzellen	DMEM + 4,5 g/l Glucose + 10 % FKS + 100 U/ml Penicillin- Streptomycin	GMP-Anlage der Klinik für Kinder- Onkologie, - Hämatologie und Klinische Immunologie der Heinrich- Heine- Universität, Düsseldorf

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

2.1.2 Zellkultur

Abkürzung	Bezeichnung	Katalognummer	Lieferant
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	61965026	Thermo Fisher Scientific, Waltham
PenStrep	Penicillin Streptomycin (10000U/ml)	15140148	Thermo Fisher Scientific, Waltham
PBS	Phosphat buffered saline	70011044	Thermo Fisher Scientific, Waltham
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	14065056	Thermo Fisher Scientific, Waltham
TE	0,5 % Trypsin-EDTA	R001100	Thermo Fisher Scientific, Waltham
TrypLeSelect	TrypLE Select Enzym	12563011	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Trypanblau	Trypanblau Färbemittel 0,4 %	T10282	Thermo Fisher Scientific, Waltham

Tabelle 2: Übersicht über die in der Zellkultur verwendeten Substanzen

2.1.3 Stimulantien und Inhibitoren

Stimulanz	Verwendung	Dosierung	Katalognummer/Lieferant
4-Methylumbeliferon	HAS-Inhibitor [31]	300 µM	Katalog-Nr.: M1508 Sigma-Aldrich, St. Louis
Dexamethason	adipogene & osteogene Differenzierung	1 µM, 0,01 µM	Katalog-Nr.: D1756 Sigma-Aldrich, St. Louis
Indometacin	adipogene Differenzierung	200 µM	Katalog-Nr.: I7378 Sigma-Aldrich, St. Louis
Insulin	adipogene Differenzierung	100 µg/ml	Katalog-Nr.: I9275 Sigma-Aldrich, St. Louis
β-Glycerol-phosphat	osteogene Differenzierung	10mM	Katalog-Nr.: G9422 Sigma-Aldrich, St. Louis
Ascorbinsäure	osteogene Differenzierung	50 µM	Katalog-Nr.: A8960 Sigma-Aldrich, St. Louis
Healon 5	Exogene Hyaluronsäure-Stimulierung	10 µg	Katalog-Nr.: 10-2900-51 Abbot Laboratories

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Stimulantien und Inhibitoren

2.1.4 Primer

Gen	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')
GAPDH	CTGAAGGTCGGAGTCAACG	TGAGGTCAATGAAGGGGTC
HYAL1	CCAAGGAATCATGTCCAGGCCAT CAA	CCCCTGGTCACGTTTCAGG
HYAL2	TTCACACGACCCACCTACAG	GTCTCCGTGCTTGTGGTGTA
HAS1	TACAACCAGAAGTTCCTGGG	CTGGAGGTGTACTIONTGGTAGC
HAS2	GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA	TCCAACCATGGGATCTTCTT
HAS3	CCTTCCCCTACCCAGAGC	GAAGTGGTAGCCCGTCACAT
CD44	GCTATTGAAAGCCTTGCAGAG	CGCAGATCGATTTGAATATAAC C
RHAMM	GAATTTGAGAATTCTAAGCTTG	CCATCATACCCCTCATCTTTGT T
LAYILIN	ATCCTAATCCCCAGCATTCC	GGTGTGTTGCTTCTTTGTGC

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer

2.1.5 Geräte

Zentrifuge	Heraus sepatech Megafuge 1.0
Zellzählgerät	Countess automated cell counter, Invitrogen
Zellkultur Werkbank	Thermo Scientific SAFE2020
Mikroskop	Zeiss Axio Observer.Z1 mit ApoTome.2, Oberkochen
qRT-PCR Gerät	Applied Biosystems StepOnePlus
cDNA Cyler	Eppendorf Master Cyler gradient
Brutschrank	Heracell 150i
Photometer	peqLab Nanodrop 1000
Wasserfilter	Milipore Biocel 0,22 µM
Wasserbad	Julabo SW-20C
Fluoreszenz-Scanner	LI-COR Odyssey CLx

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Geräte

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung der Mammakarzinomzellen

Humane epitheliale Mammakarzinomzellen (MCF-7) sowie humane mesenchymale Mamma-Adenokarzinomzellen (MDA-MB-231) wurden in *Dulbeccos Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 4,5 g/L Glukose und Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (PenStrep) bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre als subkonfluenten Monolayer kultiviert. Für das Passagieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Phosphat buffered saline (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (TE) für 3 Minuten bei 37 °C bis zum Ablösen inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Falcon überführt und für 5 Minuten bei 300 rcf zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zur Bestimmung der Zellzahl in DMEM resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 10 µl mit der äquivalenten Menge einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung gefärbt. Die Lebendzellzahl wurde durch elektronische Zellzählung bestimmt. Die Zellen wurden für Versuche mit einer Dichte von 12.500 Zellen/cm² ausgesät.

2.2.2 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

Die MSC wurden von Prof. Meisel und Dr. Özer der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie der Universitätsklinik Düsseldorf isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/L Glukose und Zusatz von 10 % FKS sowie 1 % PenStrep bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre als subkonfluenten Monolayer kultiviert. Für das Passagieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Hank's balanced salt solution (HBSS) gewaschen. Die Zellen wurden zum Ablösen für 3 Minuten mit TrypLE Select Enzym (TrypLESelect) inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Falcon überführt und für 5 Minuten bei 300 rcf zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte äquivalent zu der Zählung der Mammakarzinomzellen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 12.500 Zellen/cm² ausgesät. Für die Differenzierung der MSC erfolgte die Kultivierung in DMEM mit 1 g/L Glukose.

2.2.3 Differenzierung der Mesenchymalen Stammzellen

2.2.3.1 Osteogene Differenzierung

MSC wurden in 24-Well-Platten in DMEM mit 1 g/L Glukose und Zusatz von 10 % FKS und 1 % PenStrep ausgesät. Sobald die MSC ein konfluentes Wachstum von 80 %

aufwiesen, wurden die Wells jeweils mit 1ml Kontrollmedium (DMEM 1 g/L Glukose und 10 % FKS, 1 % PenStrep) oder 1 ml osteogenem Differenzierungsmedium (siehe Tabelle 6) bestückt.

Das Medium wurde im Differenzierungszeitraum zweimal pro Woche erneuert. Die Differenzierung wurde nach 14 - 21 Tagen gestoppt, sobald 30 - 50 % der Zellen unter dem Lichtmikroskop schwarze Calciumablagerungen zeigten. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bis zur folgenden Alizarin Rot Färbung mit 500 µl HBSS bedeckt.

Substanz	Konz. Stock-Lsg.	Konz. im Medium	Kontrolle	Differenzierung
DMEM 1 g/L Glukose	100 %	88 %	8900 µl	8690 µl
FKS	100 %	10 %	1000 µl	1000 µl
PenStrep	10000 IU/ml	100 IU/ml	100 µl	100 µl
Dexamethason	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁷ M	-	100 µl
L-Ascorbinsäure	50 mM	50 µM	-	10 µl
β-Glycerolphosphat	1 M	10 mM	-	100 µl

Tabelle 6: Herstellung von 10 ml osteogenem Differenzierungsmedium

2.2.3.2 Adipogene Differenzierung

MSC wurden in 24-Well-Platten in DMEM mit 1 g/L Glukose und Zusatz von 10 % FKS und 1 % PenStrep ausgesät. Sobald die MSC ein konfluentes Wachstum von 80 % aufwiesen, wurden die Wells jeweils mit 1ml Kontrollmedium (DMEM 1 g/L Glukose und 10 % FKS, 1 % PenStrep) oder 1 ml adipogenem Differenzierungsmedium (siehe Tabelle 7) bestückt.

Das Medium wurde im Differenzierungszeitraum zweimal pro Woche erneuert. Die Differenzierung wurde nach 14 - 21 Tagen gestoppt, sobald 30 - 50 % der Zellen unter dem Lichtmikroskop Fettvakuolen zeigten. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 4%igem PFA fixiert und bis zur Oil Red O Färbung mit 500 µl HBSS bedeckt.

Substanz	Konz Stock-Lsg.	Konz im Medium	Kontrolle	Differenzierung
DMEM 1 g/L Glucose	100 %	88 %	8900 µl	8690 µl
FKS	100 %	10 %	1000 µl	1000 µl
PenStrep	10000 IU/ml	100 IU/ml	100 µl	100 µl
Dexamethason	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁶ M	-	100 µl
Insulin	50 mM	50 µM	-	100 µl
Indometacin	2 mM	200 µM	-	1 µl

Tabelle 7: Herstellung von 10 ml adipogenem Differenzierungsmedium

2.2.4 Generierung von Überstand

Die Mammakarzinomzelllinien MCF-7, sowie MDA-MB-231 wurden in Kulturflaschen mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm² in DMEM mit 4,5 g/L Glukose und Zusatz von 10 % FKS sowie 1 % PenStrep ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium durch serumfreies DMEM mit 4,5 g/L Glukose ersetzt und für 24 Stunden inkubiert. Dieses Medium wurde anschließend abpipettiert und mit dem Spritzenvorsatzfilter Filtropur S mit einer Porengröße von 0,2 µm (Sarstedt, Nümbrecht) zur direkten Verwendung aufbereitet. Im Folgenden wird dieses Medium als *Überstand* (Ü) bezeichnet. Für die Generierung von Überstand der MSC wurden die MSC für 24 Stunden mit Überstand der Mammakarzinomzellen stimuliert. Anschließend wurde das Medium wie oben beschrieben abpipettiert und für die direkte Verwendung aufbereitet. Dieses Medium wird folgend als Überstand-MSc bezeichnet.

Ist der Überstand durch +4MU gekennzeichnet, wurde bei der Generierung der HA-Synthaseinhibitor 4-Methylumbelliferon (4MU) hinzugefügt und ebenfalls für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium äquivalent aufbereitet.

2.2.5 Proliferation von MSC nach Stimulation mit Hyaluronsäure

Für die Synchronisierung der Zellzyklusphase wurden MSC nach Aussaat für 24 Stunden in serumfreien DMEM mit 4,5 g/L Glukose kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit F HA sowie HMW HA stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen wie in 2.2.1. beschrieben gezählt und die Zellzahl verglichen.

2.2.6 Proliferation von MSC nach Stimulation mit Überstand

Für die Synchronisierung der Zellzyklusphase wurden MSC nach Aussaat für 24 Stunden in serumfreien DMEM mit 4,5 g/L Glukose kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden mit Überstandsmedium stimuliert. Die Zellen wurden folgend wie in 2.2.1. beschrieben gezählt und die Zellzahl verglichen.

2.2.7 Scratch-Assay

MCF-7 sowie MDA-MB-231 wurden in 12-Well-Platten ausgesät. Nach 6 Stunden Inkubation wurde mit einer Pipettenspitze (10 - 200 µl Pipettenspitzen, Eppendorf) ein *Scratch* mittig vom oberen bis zum unteren Rand des Wells gesetzt. Um abgelöste Zellen zu entfernen, wurden die 12-Well-Platten zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 18 Stunden mit dem Überstand-MSc stimuliert. Zu Beginn und

18 Stunden nach gesetztem *Scratch* wurden lichtmikroskopische Bildaufnahmen angefertigt und der Abstand der zellfreien Zone vermessen, sowie verglichen. Der ausgewählte Bildabschnitt im Well wurde von außen mit einem schwarzen Filzmarker gekennzeichnet.

2.2.8 Transwell-Migrations-Assay

Für den Versuch wurden 12-Well-Platten mit zugehörigen Inserts der Firma BD Biosciences verwendet. In die 12-Well-Platten wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn MSC ausgesät. In die Inserts wurden MCF-7 oder MDA-MB-231 ausgesät. Die Wells wurden mit 1 ml Kontrollmedium, Kontrollmedium+4MU, Überstand sowie Überstand+4MU bestückt. Anschließend wurden die Zellen für 18 Stunden inkubiert. Nach 18 Stunden wurden die Inserts vorsichtig mit PBS gewaschen und die Zellen auf der innenliegenden Membran mit einem Wattestäbchen entfernt. Die verbliebenen Zellen wurden für 20 Minuten mit 3,7%igem Formaldehyd fixiert. Zur Visualisierung der Zellen wurden diese für 5 Minuten mit Coomassie gefärbt und der überschüssige Farbstoff mit PBS entfernt. Die 12-Well-Platten wurden für 7 weitere Tage im Brutschrank inkubiert und die *colony forming units* mit dem Lichtmikroskop gezählt. Als *colony forming unit* wird ein Zellcluster mit mehr als 50 Zellen bezeichnet.

2.2.9 Zeitraffer-Mikroskopie und Tracking von Zellen

Für die Analyse der Motilität der Mammarkarzinomzellen wurde das 10x Objektiv des Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen) verwendet. In der Inkubationskammer des Mikroskops wurden 24 Stunden alle 10 Minuten in 3 repräsentativen Bereichen Bildaufnahmen gemacht. Die Auswertung erfolgte mit dem *manual tracking plug-in* der FIJI ImageJ Software (*National Institutes of Health, Maryland, USA*) und mit dem Software Chemotaxis und Migration Tool (Ibidi, Martinsried). Pro repräsentativem Bereich wurden 6 Zellen *getrackt* und ausgewertet. Der Zellkern wurde markiert und im Zeitraffer für 24h verfolgt, so dass die mittlere Geschwindigkeit der Zellen ermittelt wurde.

2.3 Färbungen

2.3.1 Hyaluronsäure-Färbung (Affinitätszytochemie von HA)

MSC wurden auf 18 mm Deckgläschen ausgesät und nach 24 Stunden mit PBS gewaschen. Zellen bilden unter bestimmten Bedingungen kabelähnliche HA-Stränge aus. Für die Fixierung dieser kabelähnlichen HA-Stränge wurde ein essigsaurer Puffer, bestehend aus 70 % Ethanol, 4 % PFA und 0,5 % Eisessig verwendet. Anschließend wurden die MSC mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit Biotin-gekoppeltem HABP (1:250, Hyaluronsäure-Bindeprotein, Callbiochem, Billerica) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden sie für 45 Minuten lichtgeschützt mit FITC-markierten Streptavidin (1:200, Dako, Glostrup) inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342 (Invitrogen, Karlsruhe). Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Deckgläschen mittig auf Objektträger, auf die zuvor 10 µl Prolong Gold Antifade Mountant (Life Technologies, Carlsbad) pipettiert wurde, überführt.

Für die Mikroskopie am Folgetag wurden die Objektträger lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Die Mikroskopie wurde mit dem Axio Observer.Z1 durchgeführt.

2.3.2 Immunzytochemische Färbung CD44

MSC wurden äquivalent zur HA-Färbung ausgesät. Zum Analysezeitpunkt wurden die Zellen mit 4 % PFA für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss an eine zehnminütige Permeabilisierung mit 0,3 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis) in 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) gelöst in PBS wurde für weitere 50 Minuten in 5% BSA in PBS blockiert. Die Inkubation mit dem Kaninchen anti-CD44 Antikörper (1:500, Abcam, Cambridge, Großbritannien) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen AF647 (1:200, konjugiert, Life Technologies, Eugene, OR, USA) inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen nach weiterem Waschschrift wie in 2.3.1 beschrieben auf Objektträger überführt.

2.3.3 Alizarin-Rot Färbung

Durch Alizarin-Rot kann die Ablagerung von Calciumphosphaten in der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden, da es zu einer Chelatbildung kommt. Für die Färbung sollte die 2%ige Alizarin Red S-Lösung einen pH von 4 aufweisen. Hierfür wurden 1 g Alizarin Red S in 50 ml destilliertem Wasser gelöst und filtriert (Filter Whatman 42, Herolab GmbH Laborgeräte Wieloch). Die Lösung ist bei Raumtemperatur

bis zu einem Jahr haltbar. MSC wurden für 10 Minuten mit der Lösung gefärbt und anschließend mit sterilem ultra-pure Wasser (ddH₂O) gewaschen. Zur Vermeidung von Austrocknung wurden die Zellen mit PBS bedeckt.

2.3.4 Oil Red O Färbung

Durch Oil Red O lassen sich Fettvakuolen nachweisen, welche kräftig orange bis rot erscheinen. Für die Herstellung einer 0,2%igen Oil Red O-Lösung wurde eine 0,3%ige *stock solution* hergestellt. Diese ist bei Raumtemperatur bis zu einem Jahr haltbar. Für die Herstellung der 0,2%igen Oil Red O-Lösung wurden 30 ml der *stock solution* und 20 ml destilliertes Wasser gemischt. Die Lösung wurde nach einer zehnmütigen Wartezeit filtriert (Filter Whatman 42, Herolab GmbH Laborgeräte Wieloch). Die so entstandene 0,2%ige Oil Red O-*working solution* ist 3 Stunden verwendbar. MSC wurden mit 60%igem Isopropanol gewaschen und für 10 Minuten mit der *working solution* gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit PBS bedeckt, um eine Austrocknung zu vermeiden.

2.4 Methoden

2.4.1 HABP-Immunaффinitäts-Assay

Für die Quantifizierung der sezernierten Hyaluronsäure im Medium der MSC wurde das Hyaluronic Acid Test Kit (Corgenix, Colorado) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Hyaluronsäure bindet auf der mit HABP präparierten 96-Well-Multititerplatte und wird bei einer Wellenlänge von 800 nm detektiert. Die Werte wurden auf die Proteinkonzentration der Zellen normalisiert. Freundlicherweise wurde die Quantifizierung der Hyaluronsäure von Irmhild Rüter übernommen.

2.4.2 Semiquantitative mRNA Expressionsanalyse

2.4.2.1 RNA Isolation

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit jeweils 1 ml Trizol (peqGOLD TriFast, PeqLab, Erlangen) für 10 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Dem Lysat wurde anschließend 200 µl Chloroform hinzugefügt. Nach fünfmaligen Vortexen wurde die Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 21.000 x g zentrifugiert. Die oberste wässrige Phase, in welcher die RNA enthalten ist, wurde abpipettiert und zur Fällung in einem 1:1 Verhältnis mit 2-Propanol (VWR Chemicals, Langenfeld) vermengt und über Nacht bei - 20 °C gelagert. Die verbliebende milchige Phase (DNA) sowie die organische Phase

(zelluläre Proteine) wurde verworfen. Die ausgefällte RNA wurde für 45 Minuten bei 4 °C und 21.000 x g zentrifugiert. Die flüssige Phase wurde abgesaugt und das formierte Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol (Roth, Karlsruhe) gewaschen. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 21.000 x g wurde die flüssige Phase erneut abgesaugt und die RNA für 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.4.2.2 RNA-Quantifizierung

Die Konzentration der RNA wurde mit dem NanoDrop 1000 Spektrometer (Thermo Scientific, Waltham) gemessen. Es wurden 1 µl der gelösten RNA vermessen und dabei das 260/280 nm- sowie 260/230 nm-Adsorptionsverhältnis bestimmt. Die Verhältnisse geben Auskunft über die Reinheit der RNA und Proteinverunreinigung.

2.4.2.3 cDNA-Synthese

Zur Bestimmung der mRNA Expression wurden 1 µg der RNA mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit (Quiagen, Hilden) in cDNA (kodierende DANN) umgeschrieben. Durch einen *WipeOut Buffer* wurde genomische DNA entfernt, bevor eine Mischung aus Reverse Transkriptase, Primer-Mix und Puffer hinzugefügt wurde. Diese wurde im Cycler für 30 Minuten auf 42 °C und 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die cDNA wurde in 100 µl RNase freiem Wasser verdünnt und bei 4 °C gelagert.

2.4.2.4 Quantitative Real-Time PCR

Mittels StepOnePlus RealTime PCR-System (ThermoFisher Scientific, Waltham) wurde das Expressionslevel, der zu untersuchenden Gene analysiert. Als endogene Kontrolle diente die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Proben wurden als Duplikate aufgetragen und nach der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durch die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode die relativen Expressionslevel ermittelt. Die Ausführung der qRT-PCR wurde freundlicherweise von Katharina Röck übernommen.

2.5 Statistik

Die Daten wurden mit der Software Prism 9.0 (Graphpad Software, San Diego) analysiert. Die Ergebnisse aus n unabhängigen Versuchen sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Zwei Gruppen wurden mittels t-Test, mehr als zwei Gruppen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgendem post-hoc-Test nach Sidak ausgewertet. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der HA-Matrix mesenchymaler Stammzellen

3.1.1 Relative Expression der HA-Synthasen, HA-degradierenden Enzyme und Rezeptoren

Für die Charakterisierung des HA-assoziierten Systems der verwendeten MSC wurde die Expression der Isoformen der HA-Synthasen und HA-degradierenden Enzyme sowie relevanter Rezeptoren untersucht. MSC exprimierten HAS2 mit einem relativen Anteil von 96 %, während der Anteil von HAS3 bei 3 % und der Anteil von HAS1 bei 1 % lag. Bei der Analyse der Hyaluronidasen lag die relative Expression von HYAL2 in MSC bei 99 %, wohingegen HYAL1 eine relative Expression von 1 % aufwies. RHAMM und Layilin überstiegen die relative Expression des Stammzellmarkers CD44, die bei 8 % lag.

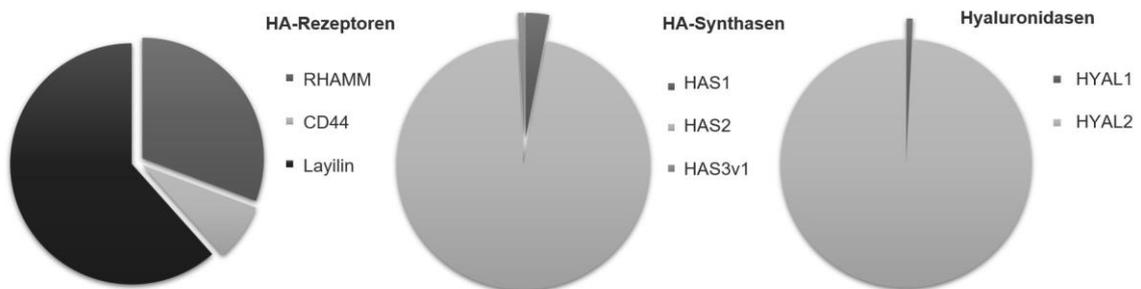


Abb. 1: Expression der HA-assoziierten Enzyme und Rezeptoren in MSC

MSC exprimieren vorwiegend HAS2 und HYAL2. Der Stammzellmarker und HA-Rezeptor CD44 wird von den verwendeten MSC exprimiert. Außerdem exprimieren MSC Layilin und RHAMM, die eine Rolle in der HA vermittelten Motilität und Adhäsion spielen. Dargestellt sind gerundete Mittelwerte.

3.1.2 Affinitätszytochemische Färbung von Hyaluronsäure

HA kann als perizelluläre Struktur an Zellmembranen gebunden sein und die Kommunikation dieser beeinflussen. Um zu verdeutlichen, dass MSC hyaluronsäurereiche Zellen sind, wurde eine HA-Färbung durchgeführt. In der affinitätszytochemischen Färbung der HA wurde die ausgeprägte perizelluläre HA-Matrix der MSC deutlich. HA bildete kabelähnliche Strukturen, die Zellen miteinander verbindet.

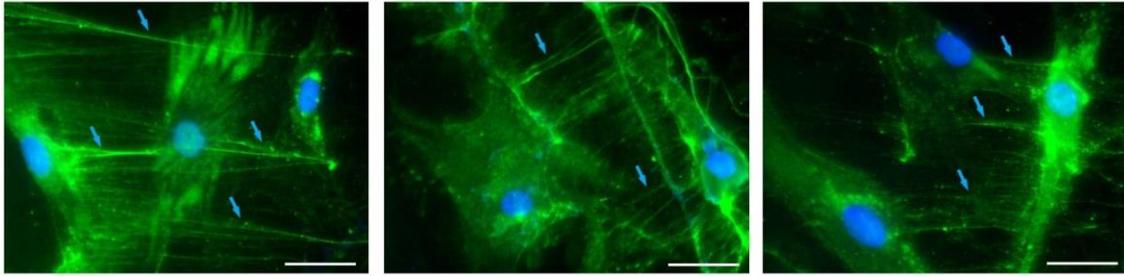


Abb. 2: MSC haben eine ausgeprägte HA-Matrix

MSC weisen eine ausgeprägte perizelluläre HA-Matrix auf. Die Pfeile verweisen auf die kabelähnlichen HA-Strukturen. Repräsentative Auswahl fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von isolierten MSC aus n = 3 Experimenten. Maßstabsbalken \triangleq 50 μ M.

3.1.3 Immunzytochemische Färbung von CD44

CD44 ist ein HA-Rezeptor und ein Stammzellmarker von MSC. Für den Nachweis der Expression und die Visualisierung von CD44 in den verwendeten MSC wurde eine immunzytochemische Färbung durchgeführt. Diese zeigte das Vorhandensein von des Rezeptors CD44 auf den verwendeten MSC.

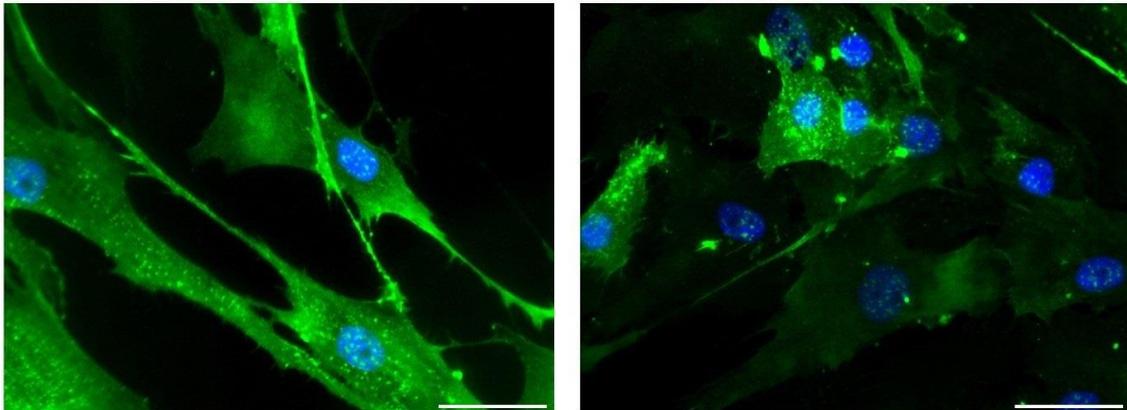


Abb. 3: MSC exprimieren CD44

Durch die immunzytochemische Färbung wurde die Expression von CD44 in den verwendeten MSC visualisiert. Repräsentative Auswahl fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von isolierten MSC aus n = 3 Experimenten. Maßstabsbalken \triangleq 50 μ M.

3.2 Proliferation von MSC nach Stimulation mit Hyaluronsäure

HA kann die Zellproliferation erhöhen, jedoch ebenso zu einem inaktiven Stadium der Zellen führen. Hierbei spielt unter anderem das Molekulargewicht eine Rolle. Um zu untersuchen, welchen Effekt extern zugeführte HA auf die Proliferation von MSC hat,

wurden MSC mit F HA und HMW HA stimuliert. Extern zugeführte HA hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation von MSC.

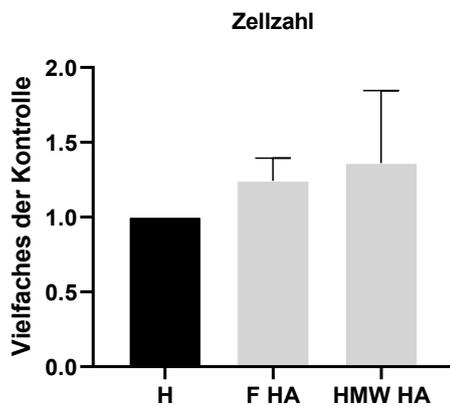


Abb. 4: Externe HA hat keinen Einfluss auf die Proliferation von MSC

F HA und HMW HA bewirken keine signifikante Steigerung der Zellzahl nach 24-stündiger Stimulation. n = 3. Mittelwert \pm SEM

3.3 HABP-Immunaффinitätsassay des Mediums von MSC nach Behandlung mit 4MU

4-MU ist ein kompetitiver HA-Synthaseinhibitor, der einen hemmenden Effekt auf die Tumorprogression hat. Um einen Effekt auf den HA-Gehalt des Mediums von MSC nach Behandlung mit 4-MU nachzuweisen, wurden die Zellen für 24 Stunden mit 300 μ M 4-MU stimuliert und anschließend der HA-Gehalt im Medium bestimmt. 4-MU reduziert den HA-Gehalt im Medium von MSC signifikant.

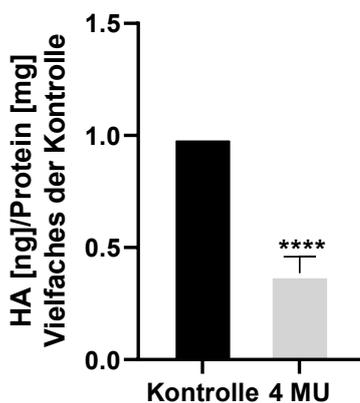


Abb. 5: 4-MU hemmt die HA-Synthese von MSC

4-MU senkt den HA-Gehalt im Medium nach 24 Stunden signifikant. Quantifizierung durch HABP-Assay. n = 4. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. ****, p < 0,0001 im Vergleich zur Kontrolle.

3.4 Einfluss von Tumorüberstand auf die Proliferation und den Hyaluronsäure-Gehalt im Medium von MSC

MSC können das TME sowie die Tumorplastizität beeinflussen und damit Tumorprogression fördern. Dabei spielen vor allem parakrine Effekte eine Rolle [32]. Die Funktion von MSC wird von dem umgebenden Milieu beeinflusst. Tumorzellen sezernieren verschiedene beeinflussende Faktoren, die zu einer Rekrutierung und Aktivierung von MSC führen können [33]. In den folgenden Versuchen sollte der parakrine Effekt der löslichen Faktoren im Medium von Mammakarzinomzellen, insbesondere auf die Proliferation und HA-Synthese nachgewiesen werden. Es wurde die Zelllinie MCF-7, die als wenig invasiv und gut differenziert beschrieben wird und die hoch invasive, wenig differenzierte Zelllinie MDA-MB-231 verwendet, um mögliche Unterschiede zu beschreiben.

3.4.1 Proliferation von MSC nach Stimulation mit Überstand

Die Proliferation von MSC konnte durch eine 48-stündige Stimulation mit Überstand von MCF-7 signifikant gesteigert werden. Die Stimulation mit Überstand von MDA-MB-231 zeigte ebenfalls eine signifikante Steigerung der Proliferation von MSC. Die Proliferation wurde durch die Zählung der Zellzahl in der jeweiligen Bedingung ermittelt.

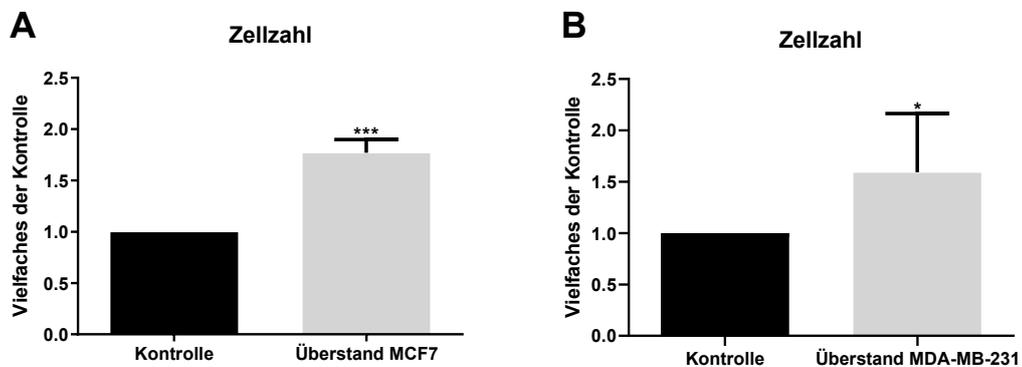


Abb. 6: Lösliche Faktoren von Brustkrebszellen steigern die Proliferation von MSC
A Der Überstand von MCF-7 führt zu einer gesteigerten Proliferation von MSC. n = 6. **B** Der Überstand von MDA-MB-231 führt zu einer gesteigerten Proliferation von MSC. n = 3. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.4.2 HABP-Immunitätsassay von MSC nach Stimulation mit Überstand und 4-MU

Der HA-Gehalt des Mediums von MSC wurde nach Stimulation mit Überstand von MCF-7 und MDA-MB-231 bestimmt. Des Weiteren wurde der Effekt von 4-MU auf die HA-Synthese von nicht-stimulierten und stimulierten MSC untersucht. Nach der Stimulation mit Überstand von MCF-7 konnte eine signifikant höhere Menge HA im Medium von MSC detektiert werden. Die Stimulation mit Überstand von MDA-MB-231 zeigte keinen signifikanten Effekt auf die HA-Synthese von MSC. 4-MU führt zu einer signifikanten Abnahme der HA im Medium von MSC. Der HA-Gehalt im Medium von MSC, die mit Überstand von MCF-7 stimuliert wurden, konnte durch die Hinzugabe von 4-MU in den Überstand signifikant reduziert werden.

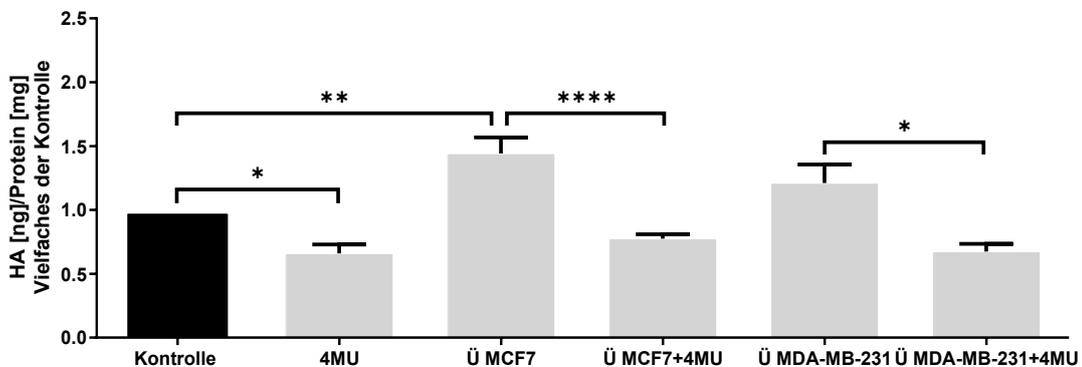


Abb. 7: Der Überstand von MCF-7 induziert die HA-Synthese in MSC, dieser Effekt kann durch 4-MU inhibiert werden

4-MU führt zu einer signifikanten Abnahme des HA-Gehalts im Medium von MSC. Die Stimulation mit dem Überstand von MCF-7 führt zu einer signifikanten Zunahme des HA-Gehalts im Medium der MSC. Dieser Effekt kann durch 4-MU revertiert werden. $n = 6$. Die Stimulation mit dem Überstand der MDA-MB-231 hat keinen signifikanten Effekt auf den HA-Gehalt des Mediums der MSC. Jedoch führt 4-MU im Überstand der MDA-MB-231 zu einer signifikanten Abnahme des HA-Gehaltes im Medium der MSC. $n = 3$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ****, $p < 0,0001$, im Vergleich zur Kontrolle.

3.4.3 Hyaluronsäure-Affinitätszytochemie von mesenchymalen Stammzellen nach Stimulation mit Überstand

Um den Effekt des Überstandes der Mammakarzinomzellen auf die HA-Matrix der MSC zu visualisieren, wurde eine Affinitäts-Färbung von HA durchgeführt. MSC zeigten eine ausgeprägtere HA-Matrix mit deutlicher Kableformation nach Stimulation mit Überstand von MCF-7 und MDA-MB-231.

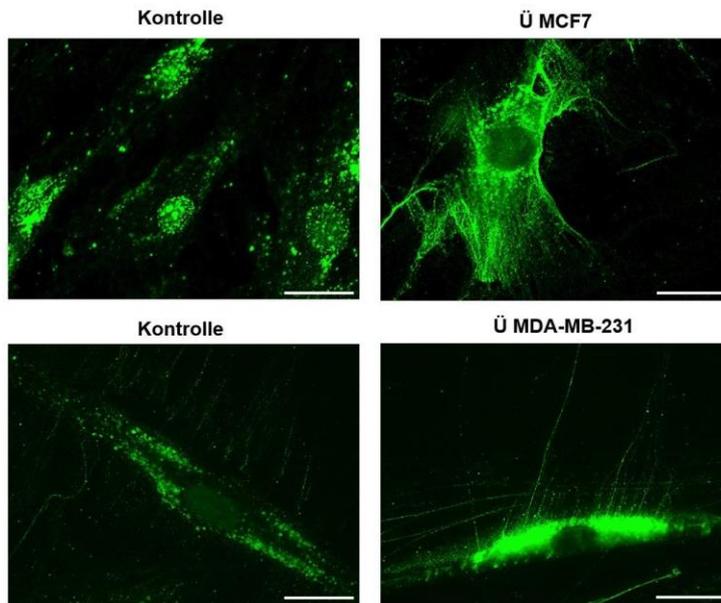


Abb. 8: Brustkrebszellen modulieren die HA-Matrix von MSC

MSC zeigen eine ausgeprägte HA-Matrix nach Stimulation mit Überstand von MCF-7 und MDA-MB-231 im Vergleich zur Kontrolle. Repräsentative Auswahl fluoreszenzmikroskopischer Bildaufnahmen aus $n = 3$ Experimenten. Maßstabsbalken $\triangleq 50 \mu\text{M}$.

3.5 Differenzierung von MSC

3.5.1 Adipogene und osteogene Differenzierung

MSC sind multipotente Stammzellen, welche die Fähigkeit besitzen, in verschiedene Gewebe zu differenzieren. Um den Stammzellcharakter der verwendeten MSC nachzuweisen, wurden die Zellen adipogen und osteogen differenziert. Nach 14 - 21 Tagen Stimulation mit adipogenem bzw. osteogenem Differenzierungsmedium wiesen die MSC Fettvakuolen bzw. Calciumablagerungen auf. Die Fettvakuolen wurden durch eine Oil Red O Färbung und die Calciumablagerung durch eine Alizarin-S Färbung deutlich sichtbar und wurden mittels lichtmikroskopischen Aufnahmen festgehalten.

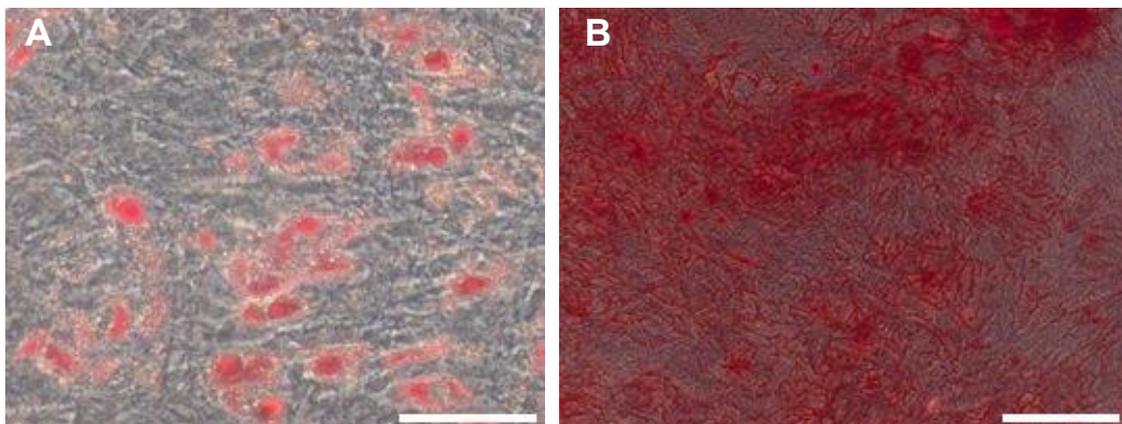
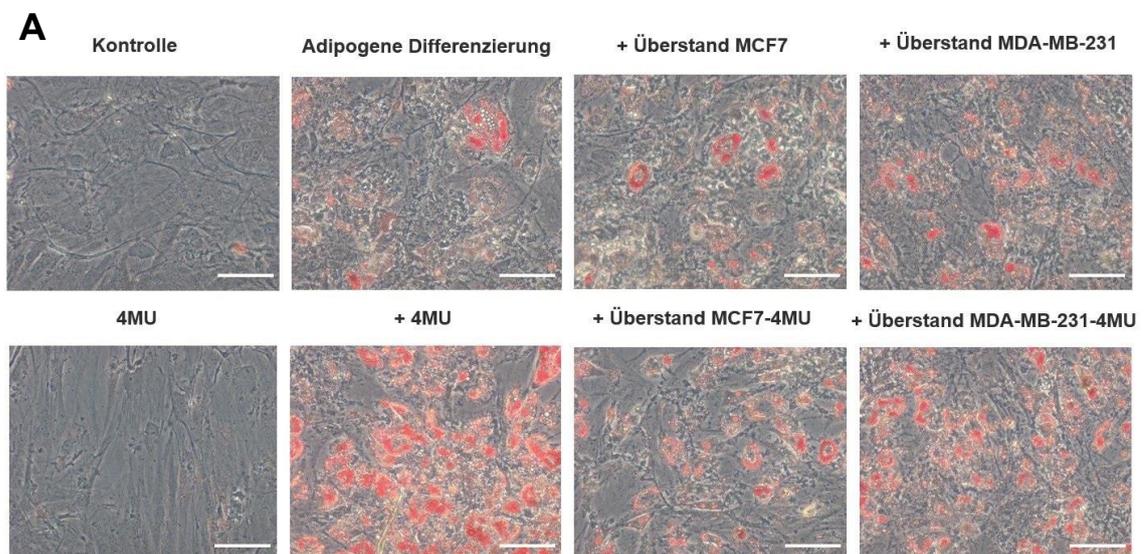


Abb. 9: Nachweis der Multipotenz der verwendeten MSC anhand ihres Potenzials zu adipogener und osteogener Differenzierung

Repräsentative Auswahl lichtmikroskopischer Aufnahmen nach adipogener Differenzierung und Oil Red O Färbung (**A**, n = 11), sowie nach osteogener Differenzierung und Alizarin S Färbung (**B**, n = 3). Sowohl Calciumablagerungen, als auch Fettvakuolen stellen sich durch die Färbungen rot-orange dar. Maßstabsbalken \cong 50 μ M.

3.5.2 Inhibition der HA-Synthese fördert die adipogene Differenzierung

In vorausgehenden Versuchen wurde der Einfluss von Mammakarzinomzellen auf die HA-Matrix mesenchymaler Stammzellen untersucht. Um den Einfluss von HA auf die Differenzierung von MSC nachzuweisen, wurden MSC unter Zugabe von 300 μ M 4-MU adipogen differenziert. Außerdem wurden MSC in Überstand der MCF-7 und MDA-MB-231 mit und ohne Zugabe von 300 μ M 4-MU adipogen differenziert. Es konnte gezeigt werden, dass 4-MU zu einer gesteigerten adipogenen Differenzierung führt. Während der Differenzierung in Überstand der MDA-MB-231 bildeten sich tendenziell mehr Fettvakuolen unter Zugabe von 4-MU, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.



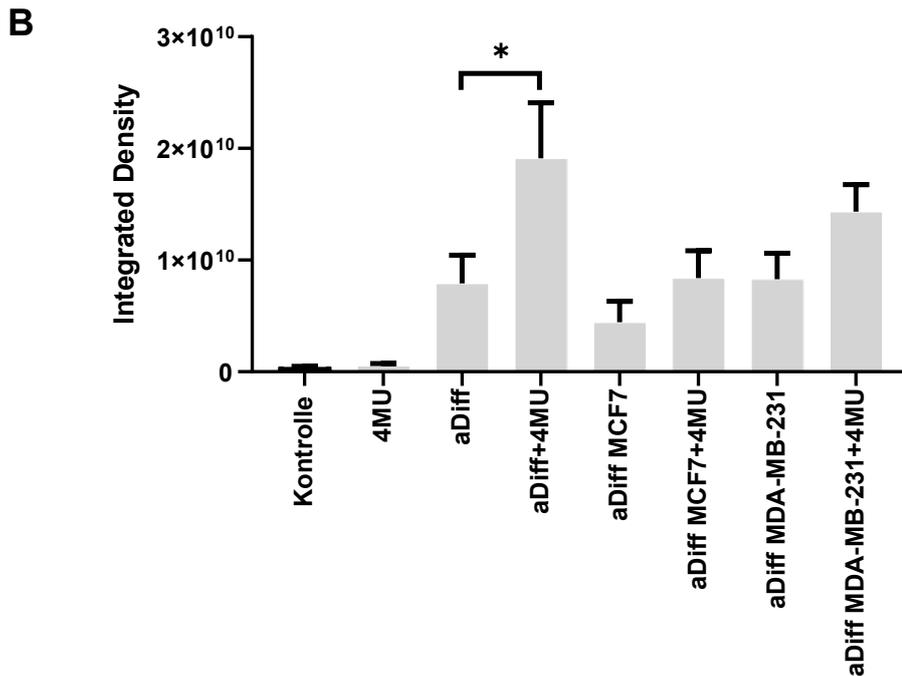


Abb. 10: 4-MU steigert die adipogene Differenzierung von MSC

A Repräsentative Auswahl lichtmikroskopischer Aufnahmen aus n = 5 Experimenten, der mit Oil Red O gefärbten, adipogen differenzierten MSC im Vergleich zur Kontrolle. Maßstabsbalken \triangleq 50 μ M. **B** 4-MU führt zu einer signifikant gesteigerten Ausbildung von Fettvakuolen während der adipogenen Differenzierung von MSC. Der Effekt von 4-MU während der adipogenen Differenzierung konnte tendenziell auch bei MSC, die in Überstand von MDA-MB-231 sowie MCF-7 differenziert wurden, beobachtet werden (A). In der Auswertung ergab sich jedoch keine Signifikanz. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen: *, p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

3.6 Einfluss von MSC und HA auf die Motilität und Migration von Mammakarzinomzellen

Mammakarzinomzellen unterscheiden sich in ihrem metastatischen Potential. MSC beeinflussen das Tumormilieu, aber auch das Milieu bestimmter Gewebe, die nach der „seed and soil“ Hypothese als prämetastatische Nische dienen können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mammakarzinomzellen die HA-Synthese von MSC steigern. Um einen Einfluss der durch Tumorzellen aktivierten MSC, sowie HA auf die Motilität und Migration von Brustkrebszellen nachzuweisen, wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

3.6.1 Scratch Assay von MCF-7 und MDA-MB-231 nach Stimulation mit Überstand von MSC

Im durchgeführten *Scratch Assay* konnte gezeigt werden, dass der Überstand von stimulierten MSC die Migration von MCF-7 und MDA-MB-231 signifikant steigert. Dieser Effekt konnte durch 4-MU inhibiert werden. Der Überstand der Mammakarzinomzellen hatte keinen Effekt auf die Migration.

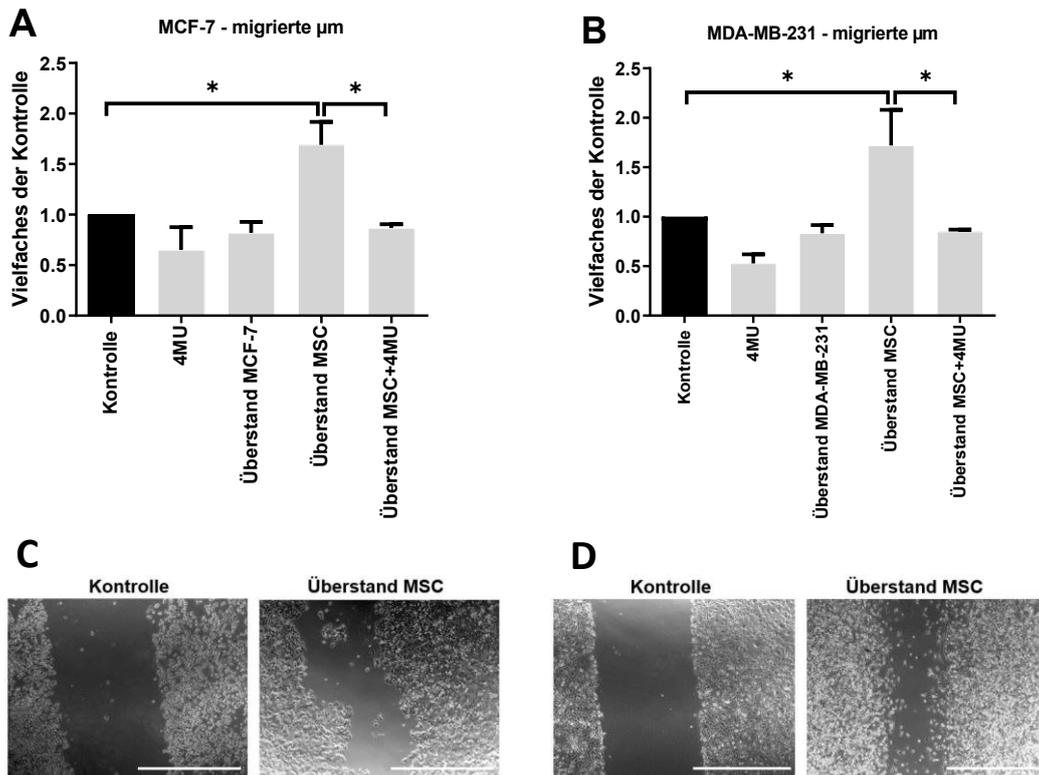


Abb. 11: Der Überstand von MSC, die mit Tumorüberstand stimuliert wurden, erhöht die Migration von Brustkrebszellen, 4-MU revertiert diesen Effekt **A** Der Überstand von MSC, die zuvor mit Überstand der MCF-7 stimuliert wurden, führt zu einer gesteigerten Migration von MCF-7. Dieser Effekt kann durch 4-MU revertiert werden. **B** Der Überstand von MSC, die zuvor mit Überstand von MDA-MB-231 stimuliert wurden, führt zu einer gesteigerten Migration von MDA-MB-231. Dieser Effekt kann durch 4-MU revertiert werden. Repräsentative lichtmikroskopische Bildaufnahmen aus $n = 3$ Experimenten von MCF-7 (**C**) und MDA-MB-231 (**D**) zum Zeitpunkt der Durchführung des Scratches, sowie 16 Stunden danach. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. Maßstabsbalken $\triangleq 500 \mu\text{M}$.

3.6.2 Transwell-Migrations-Assay von MCF-7 und MDA-MB-231 nach Stimulation mit Überstand von MSC

Bei der Auswertung des Transwell Migrations Assay konnten eine signifikante Zunahme der Migration von MCF-7 und MDA-MB-231 durch die Insert-Membran detektiert werden.

Durch die Quantifizierung der Farbintensität der Zellen im Odyssey M Imager konnte der bereits per Lichtmikroskop wahrgenommene Unterschied bestätigt werden (Abbildung 13).

Um nachzuweisen, ob sich einzelne Tumorzellen absiedelten, wurden die 12-Well-Platten für weitere 7 Tage inkubiert und anschließend ausgewertet, ob es zu einer Bildung von Tumorkolonien kam. Als Kolonie wurde hierbei eine Zellansammlung von fünfzig oder mehr Zellen bezeichnet.

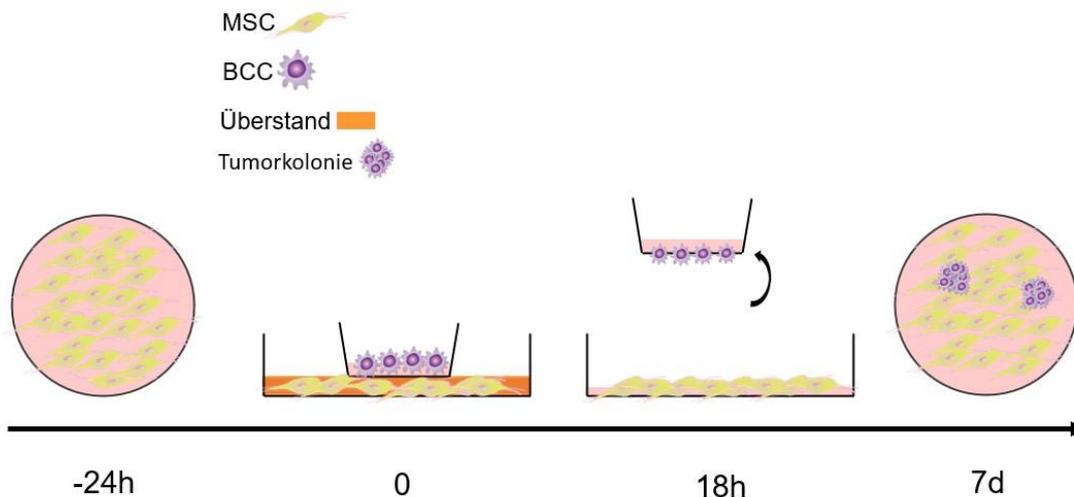


Abb. 12: Versuchsaufbau des Transwell Migrations Assays

MSC wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn ausgesät. Zum Zeitpunkt 0 wurde das jeweilige Medium in die Wells hinzugefügt und die Inserts mit Mammakarzinomzellen bestückt. Es folgte eine Inkubation für 18h. Anschließend wurden die Inserts entfernt, die Migration der Mammakarzinomzellen ausgewertet und die 12-Well-Platten für weitere 7 Tage inkubiert.

Sowohl MCF-7, als auch MDA-MB-231, die in Inserts gesät wurden, in denen MSC mit Überstand der jeweiligen Mammakarzinomzelllinie stimuliert wurden (Abbildung 12), bildeten signifikant mehr Tumorkolonien als die Kontrolle. Die Bildung der Tumorkolonien wurde durch 4-MU nicht signifikant gehemmt. Des Weiteren fiel auf, dass MDA-MB-231 mehr Tumorkolonien bildeten als MCF-7.

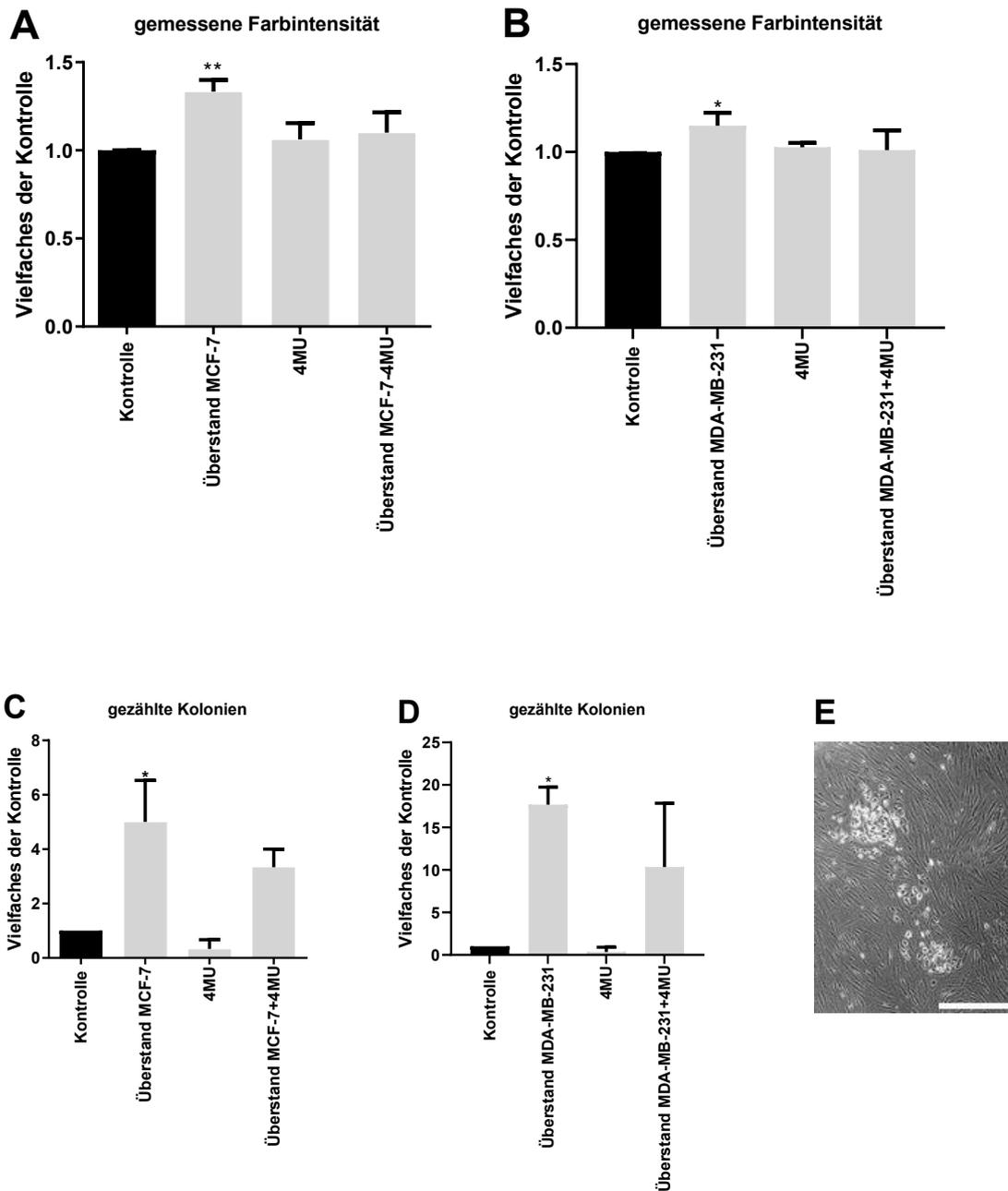


Abb. 13: Mit Tumorüberstand stimulierte MSC steigern die Migration von Brustkrebszellen und fördern die Bildung von Tumorkolonien

A MCF-7 migrieren signifikant mehr, wenn MSC mit Überstand von MCF-7 stimuliert wurden. **B** MDA-MB-231 weisen eine signifikant höhere Migration auf, wenn MSC mit Überstand von MDA-MB-231 stimuliert wurden. **C** Die Stimulation von MSC mit Tumorüberstand steigerte die Ausbildung von Tumorkolonien der MCF-7 signifikant. **D** Nach Stimulation von MSC mit Überstandsmedium der MDA-MB-231 bildeten MDA-MB-231 signifikant mehr Tumorkolonien aus. **E** Exemplarische, lichtmikroskopische Aufnahme einer Tumorkolonie von MCF-7. $n = 3$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, im Vergleich zur Kontrolle. Maßstabsbalken $\cong 50 \mu\text{M}$.

3.6.3 HA steigert die Motilität von Mammakarzinomzellen in der Zeitraffer-Mikroskopie

HA kann Rezeptor-vermittelt die Motilität von Brustkrebszellen beeinflussen. Invasive Brustkrebszellen produzieren mehr endogene HA, um ihre Motilität zu steigern.

Deshalb wurde untersucht, ob das Molekulargewicht extern zugeführter HA einen Einfluss auf die Motilität der Mammakarzinomzellen hat. Hierfür wurden MCF-7 und MDA-MB-231 mit F HA und HMW-HA stimuliert und durch eine Zeitraffer-Mikroskopie beobachtet.

F HA steigert die Motilität von MCF-7 signifikant. HMW-HA hatte keinen Einfluss auf die Motilität dieser Zelllinie. Dahingegen steigerte HMW-HA die Motilität von MDA-MB-231 signifikant. F HA hatte keinen Effekt auf die Beweglichkeit der MDA-MB-231 (Abbildung 14).

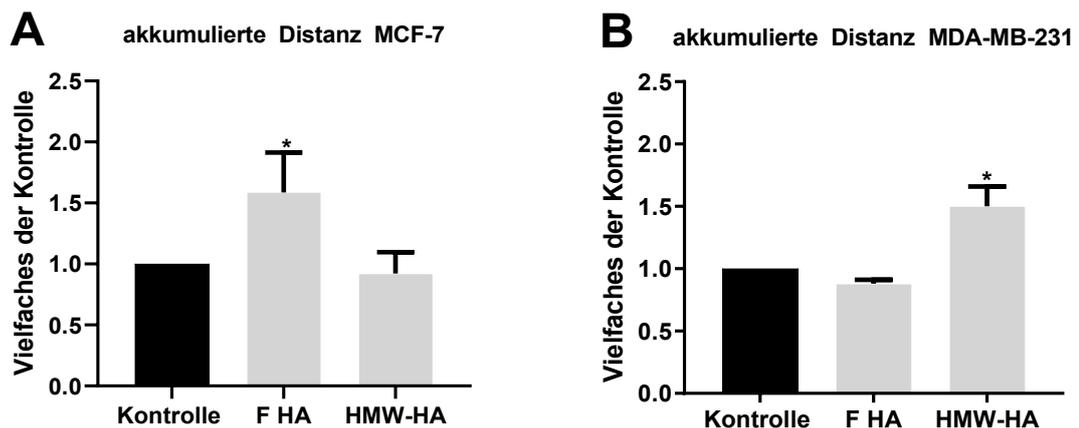


Abb. 14: Die Motilität von Brustkrebszellen wird durch F HA und HMW HA gesteigert

A F-HA steigerte die Motilität von MCF-7 signifikant. **B** Die Motilität von MDA-MB-231 wurde durch die Stimulation mit HMW-HA signifikant erhöht. n =3. Dargestellt sind Mittelwerte +- SEM.

*, p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

4 Diskussion

4.1 HA-Matrix mesenchymaler Stammzellen

HA ist eine der Hauptkomponenten im Knochenmark; daher liegt es nahe, dass MSC, als Bestandteil des Knochenmarks, in der Lage sind, HA zu synthetisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die relative Expression der HA-assoziierten Enzyme analysiert. MSC exprimieren alle drei Isoformen der HAS. Dieses Ergebnis konnte auch in anderen Untersuchungen bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit war HAS2, mit einer relativen Expression von 96 % die vorwiegend exprimierte HAS (HAS3 3 %, HAS1 1 %). Die relative Expression scheint jedoch von den vorliegenden Umgebungsfaktoren und Pathologien abhängig zu sein. So konnte gezeigt werden, dass MSC von gesunden Spendern vorwiegend HAS2 exprimieren, während in MSC von Patienten, die an einem Multiplen Myelom erkrankt waren, die Expression der HAS1 hochreguliert wurde [34]. Eine erhöhte Expression von HAS2 ist jedoch in vielen soliden Tumoren, wie auch dem Mammakarzinom, mit Tumorprogression assoziiert [35, 36]. Sowohl HAS1 als auch HAS2 produzieren HA mit einem Molekulargewicht von etwa 2 MDa, was der HMW-HA entspricht. MSC synthetisieren große Mengen HA, die am CD44-Rezeptor gebunden ist. In den verwendeten MSC konnte die Expression von CD44 nachgewiesen werden. Durch die Bindung an den Rezeptor entsteht eine HA-Schicht, die autokrine Signalwege induziert und dazu beiträgt, dass MSC ihre Stammzeleigenschaften erhalten [37, 38]. Die stark ausgebildete HA-Kabel-Formation konnte in dieser Arbeit durch immunzytochemische Färbungen visualisiert werden. Die ausgeprägte HA-Matrix ermöglicht MSC nicht nur die Aktivierung von autokrinen Signalwegen, sondern macht sie zu wichtigen Interaktionspartnern von beispielsweise Tumorzellen und fördert deren Adhäsion und Migration. Die Degradation von HA erfolgt durch Hyaluronidasen. Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten MSC, mit einer relativen Expression von 99 % fast ausschließlich HYAL2 exprimieren. HYAL2 degradiert vor allem HMW-HA, die an CD44 gebunden ist. Eine Hochregulation von HYAL2 erleichtert die Degradation der HA und damit die Migration, vor allem in steifere Matrix, wie sie in Tumorgewebe vorkommt [39, 40].

Eine signifikante Steigerung der Proliferation von MSC durch externe Zugabe von HA konnte nicht beobachtet werden. Möglicherweise hätte eine Veränderung der hinzugefügten Konzentration der HA zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation geführt. Vereinbar ist die Überlegung mit den Beobachtungen aus anderen Studien, in denen HA die Stammzeleigenschaften von MSC bewahrt und konzentrationsabhängig ihre Proliferation beeinflusst. [41, 42].

4.2 Einfluss von löslichen Faktoren von Mammakarzinomzellen auf die HA-Matrix und Proliferation von MSC

MSC sind ein wichtiger Bestandteil des TME und unterstützen durch ihre immunmodulatorischen Fähigkeiten und dem Umbau der EZM die Tumorprogression [43, 44]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss löslicher Faktoren von Mammakarzinomzellen auf die HA-Synthese und Proliferation von MSC untersucht. Dafür wurde der Überstand der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zur Stimulation genutzt. Durch den HABP-Immunaффinitätsassay konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Überstand von MCF-7 die HA-Synthese in MSC signifikant steigerte. Lösliche Faktoren im Überstand der MCF-7 scheinen die HA-Synthese zu induzieren. Dieser Effekt konnte durch 4-MU aufgehoben werden. Wie in Abbildung 1 ersichtlich, stellt HAS2 die vorwiegend exprimierte Isoform in den verwendeten MSC dar, so dass HAS2 für die gesteigerte HA-Synthese verantwortlich sein könnte. Um eine genauere Aussage zu treffen, müsste jedoch die relative Expression der HAS-Isoformen vor und nach Stimulation mit Überstand der Mammakarzinomzellen verglichen werden. In fortgeführten und bereits publizierten Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte auch eine Steigerung der HA-Synthese durch den Überstand von MDA-MB-231 in MSC gezeigt werden [45]. Der Effekt beider Mammakarzinomzelllinien auf die HA-Matrix von MSC wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine Affinitätszytochemie visualisiert. MSC bildeten nach Stimulation mit Überstand eine deutlich ausgeprägtere HA-Matrix mit Kabelformation als die Kontrolle. Außerdem hatte der Überstand einen Effekt auf die Proliferation von MSC. Sowohl nach Stimulation mit dem Überstand der MCF-7, als auch der MDA-MB-231 konnte eine signifikant erhöhte Proliferation beobachtet werden. Um die genauen Signalwege dieses Effektes zu identifizieren, müsste der Überstand der Brustkrebszelllinien analysiert werden. Ebenso wurde ein genauer Mechanismus für die gesteigerte HA-Synthese bislang noch nicht aufgeklärt. Dennoch könnten eine verstärkte Proliferation und HA-Synthese durch MSC vorteilhaft für Tumorzellen sein. Durch ihre hydrophilen Eigenschaften kann HA Zell-Zell-Kontakte lösen und so zum Beispiel EMT induzieren, ein zentraler Mechanismus für die Tumorprogression und Metastasierung [46].

4.3 Einfluss der HA und löslicher Faktoren von Brustkrebszellen auf die adipogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

MSC sind multipotente Stammzellen, die sich in verschiedene Gewebe mesodermalen Ursprungs entwickeln können. Dies war eine Voraussetzung für die durchgeführten Versuche. Ein in der Literatur bekanntes Problem ist die Heterogenität von kultivierten MSC [47]. Ihre Eigenschaften sind von der Isolierungstechnik, der Kultivierung, dem

Gewebeursprung und des Spenders abhängig. Ihre Stammzeleigenschaften bleiben während der Kultivierung durch den Zell-Zell-Kontakt erhalten, können aber durch weitere Passagierung im Verlauf verloren gehen. Dieses Kenntnis ist nicht nur für die Tumorforschung, sondern auch für die Verwendung von MSC in der Zelltherapie äußerst relevant [16]. Um den Stammzellcharakter, sowie den Einfluss von HA auf die Differenzierung zu untersuchen, wurden die verwendeten MSC in Adipozyten und Osteoblasten differenziert. In den nachfolgend durchgeführten Färbungen konnte die Differenzierung in Adipozyten und Osteoblasten visualisiert und damit die Multipotenz der verwendeten MSC nachgewiesen werden.

Das Differenzierungspotential von MSC kann je nach Tumorentität beeinflusst werden. Liu et al. zeigten, dass MSC in der Präsenz von Mammakarzinomzellen zu Adipozyten differenzieren können. Die Adipozyten sezernieren Wachstumsfaktoren und Zytokine, die eine Migration und Invasion von Brustkrebszellen fördern [18]. Daten, in denen die Hemmung der adipogenen Differenzierung von MSC via Exosomausschüttung durch Prostatakarzinomzellen gezeigt wurde, unterstreichen jedoch die Relevanz der Tumorentität [48]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass lösliche Faktoren von MCF-7 die HA-Synthese steigern. Deshalb wurde zunächst der alleinige Einfluss von HA auf die adipogene Differenzierung untersucht, um im nächsten Schritt den Einfluss der HA-Modulation durch die löslichen Faktoren der Mammakarzinomzellen auf die Differenzierung von MSC zu analysieren.

Interessanterweise führte die Hemmung der HA-Synthese während der Differenzierung zu einer signifikanten Steigerung der adipogenen Differenzierung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass HA einen Einfluss auf die Differenzierung von MSC zu haben scheint. Dieser bedarf jedoch einer weiteren Untersuchung, denn aktuell ist der Einfluss von HA auf die adipogene Differenzierung von MSC weitestgehend ungeklärt. HA scheint für die Erhaltung des Stammzellcharakters von MSC relevant zu sein [49]. Eine erhöhte Synthese von HA spielt dagegen während der Osteo- und Chondrogenese eine wichtige Rolle [46]. So führte in anderen Arbeiten die exogene Zufuhr von HA zu einer Steigerung der chondrogenen Differenzierung von MSC [50].

Um den Einfluss der HA-Modulation durch die löslichen Faktoren der Mammakarzinomzellen zu untersuchen, wurden MSC in deren Überstand adipogen differenziert. Der Überstand von MDA-MB-231 sowie MCF-7 führte nicht zu einer Zunahme der adipogenen Differenzierung. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit Daten unserer Arbeitsgruppe, die ebenfalls keine Steigerung der adipogenen Differenzierung durch Überstand von Mammakarzinomzellen zeigten. Insbesondere der Überstand von MDA-MB-231 hemmte die adipogene Differenzierung und förderte so die Erhaltung des

immunmodulatorischen Potentials von MSC. Für die Zelllinie MCF-7 konnte kein hemmender Einfluss auf die adipogene Differenzierung gezeigt werden [45], obwohl der Überstand zu einer Steigerung der HA-Synthese in MSC führte. Diese Beobachtung legt nahe, dass HA nicht der einzige regulierende Faktor zu sein scheint und der Tumorsubtyp relevant sein könnte. Zhao et al. zeigten, dass die adipogene Differenzierung von MSC die Invasivität von MCF-7 im Transwell-Migrationsassay erhöht [51]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zum einen scheint der Tumorsubtyp Einfluss auf die Differenzierung von MSC zu nehmen, zum anderen unterschiedliche Signalkaskaden vorteilhaft für die Invasivität unterschiedlicher Tumorsubtypen sein könnten.

4.4 Einfluss von MSC und HA auf die Motilität und Migration von Mammakarzinomzellen

Lösliche Faktoren von Tumorzellen aktivieren MSC zu TA-MSC, die Proteine der EZM produzieren und somit zu einem EZM-Remodeling führen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mammakarzinomzellen die HA-Synthese von MSC steigern. Von Interesse war es daher, den Effekt von stimulierten MSC auf die Migration von Mammakarzinomzellen zu untersuchen und ob eine Inhibition der HA-Synthese für diesen Vorgang relevant ist.

Aus Abbildung 11 geht hervor, dass der Überstand von stimulierten MSC die Migration der MCF-7 und MDA-MB-231 signifikant erhöht. Ein relevanter Aspekt ist hierbei, dass dieser Effekt durch 4-MU inhibiert werden konnte. In mehreren Studien wurde aufgezeigt, dass MSC die Migration von Tumorzellen durch verschiedene Signalwege steigern können [52, 53]. Ein bedeutender Mechanismus in diesem Zusammenhang ist die durch MSC induzierte EMT [54]. Tumorzellen erlangen einen mesenchymalen Phänotyp, der sich ebenfalls in der Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin und α -SMA und dem Verlust von E-Cadherin widerspiegelt [55]. Es ist bekannt, dass eine erhöhte HA-Synthese EMT induzieren kann [56]. TGF- β kann die Expression von HAS2 hochregulieren und so zu einer gesteigerten HA-Synthese führen. Erhöhte HA-Level in Tumoren sind im Allgemeinen mit einer schlechteren Prognose assoziiert [57]. In zahlreichen Studien wurde der Effekt von 4-MU auf verschiedene Tumorentitäten untersucht [58]. Die Behandlung mit 4-MU führte bei der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 zu einer Abnahme der Zellmotilität, Migration und Proliferation. Ebenso konnte die Migration von MCF-7 durch eine Behandlung mit 4-MU reduziert werden [31, 59]. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit. Durch 4-MU konnte die Migration der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und

MCF-7 signifikant reduziert werden. Der Effekt des Überstandes von MSC auf die Migration der Mammakarzinomzellen wurde durch 4-MU also revertiert.

Die Inhibition der HA-Synthese beeinträchtigt nicht nur die Tumorzellen selber, sondern ebenso die Ausbildung der perizellulären Matrix, sowie den Umbau der EZM. Der verminderte pro-metastatische Umbau könnte die Tumorinvasivität reduzieren [58, 59]. Tumorzellen, die durch EMT einen mesenchymalen Phänotyp angenommen haben, sind in der Lage in sekundäre Organe zu migrieren und Metastasen zu bilden [60]. Um die Migration der verwendeten Mammakarzinomzellen in einem weiteren Versuch zu untersuchen, wurde ein Transwell Migrations-Assay durchgeführt. Die Quantifizierung der migrierten Tumorzellen durch den Odyssey M Imager zeigte eine signifikante Zunahme der Migration. Außerdem konnte nach sieben Tagen eine Ausbildung von Tumorkolonien inmitten der MSC beobachtet werden. Es konnten signifikant mehr Tumorkolonien gezählt werden, wenn die MSC mit Überstand der jeweiligen Mammakarzinomzelllinie stimuliert wurden. Daraus resultiert, dass eine ausgeprägte HA-Matrix von MSC die Adhäsion von Mammakarzinomzellen erleichtern könnte. 4-MU reduzierte die Anzahl der gezählten Tumorkolonien jedoch nicht signifikant. Diese Beobachtung ist vereinbar mit der Tatsache, dass die Migration und Adhäsion von Tumorzellen durch mehrere Faktoren, wie die Ausschüttung von Chemokinen und inflammatorischen Zytokinen bedingt wird [61]. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob extern zugeführte HA einen Einfluss auf die Motilität von Mammakarzinomzellen hat. HA reguliert als eine der Hauptkomponenten der EZM die Migration, Invasion und somit die Progression von Tumoren. Es wird zwischen der HMW-HA und F HA differenziert, die sich nicht nur in ihrem Molekulargewicht voneinander unterscheiden. HMW-HA wird in der Regel als tumorprotektiv beschrieben. F HA wirkt dagegen pro-inflammatorisch und fördert die Invasivität von Tumoren. Während der Tumorprogression akkumulieren jedoch beide Formen der HA im TME. Die erhöhte Synthese von HMW-HA fördert das Tumorwachstum und verhindert die Apoptose von Tumorzellen. Außerdem entsteht durch die forcierte Degradation der HMW-HA weitere F HA, die im Tumorgewebe akkumuliert. Die Interaktion von F HA und RHAMM führt zu einer gesteigerten Motilität von Tumorzellen [62, 63]. Diese Beobachtungen decken sich mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, in dem gezeigt werden konnte, dass F HA die Motilität von MCF-7 signifikant steigert. Dagegen führte erstaunlicherweise die Stimulation von MDA-MB-231 mit HMW-HA zu einer signifikant höheren Motilität. Hamilton et al. konnten zeigen, dass die Motilität der invasiveren MDA-MB-231 in einem höheren Maße von HA abhängig ist, als die Motilität der weniger invasiven MCF-7 und deshalb unterschiedliche Signalwege eine Rolle spielen. So weisen MDA-MB-231 eine erhöhte Expression der 85 kDa und 63 kDa Isoform von RHAMM auf, welche zu einer gesteigerten Aktivierung

des ERK *pathway* führt [64]. Außerdem synthetisieren MDA-MB-231 selber erhöhte Mengen HA. Um genauere Aussagen darüber zutreffen, ob der Effekt der HMW-HA durch die oben genannten RHAMM Isoformen erklärt werden könnte, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass lösliche Faktoren von Mammakarzinomzellen die HA-Matrix mesenchymaler Stammzellen modulieren und ihre Proliferation fördern. Stimulierte mesenchymale Stammzellen bilden eine ausgeprägte Hyaluronsäure-Matrix und extrudieren Hyaluronsäure in ihre Mikromilieu. Die Akkumulation der Hyaluronsäure führt zu einem pro-metastatischen Milieu, welches die migratorische Aktivität und Motilität der Mammakarzinomzellen MCF-7 und MDA-MB-231 fördert. Um die löslichen Faktoren der Mammakarzinomzellen, die für die Beeinflussung der mesenchymalen Stammzellen eine Rolle spielen, zu identifizieren, könnte eine massenspektrometrische Untersuchung des Sekretoms aufschlussreich sein (Abbildung 15).

Der Einfluss von Hyaluronsäure auf die adipogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen ist bislang weitestgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Hemmung der Hyaluronsäure-Synthese die adipogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen steigert. In fortgeführten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass die Hemmung der adipogenen Differenzierung durch die Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 möglicherweise für die Erhaltung des immunmodulatorischen Potentials der mesenchymalen Stammzellen von Bedeutung ist. Die Mammakarzinomzellen MCF-7 scheinen die adipogene Differenzierung jedoch nicht zu beeinflussen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass weitere Faktoren die adipogene Differenzierung beeinflussen und der Tumorsubtyp eine wichtige Rolle spielt.

Mesenchymale Stammzellen haben durch ihre Multipotenz und Fähigkeit, das Tumormikromilieu zu beeinflussen eine entscheidende Funktion in der Tumorprogression. So könnte die Einflussnahme auf die Hyaluronsäure-Matrix mesenchymaler Stammzellen ein weiterer Angriffspunkt für Tumorthérapien darstellen, der jedoch noch weiterer Untersuchungen bedarf.

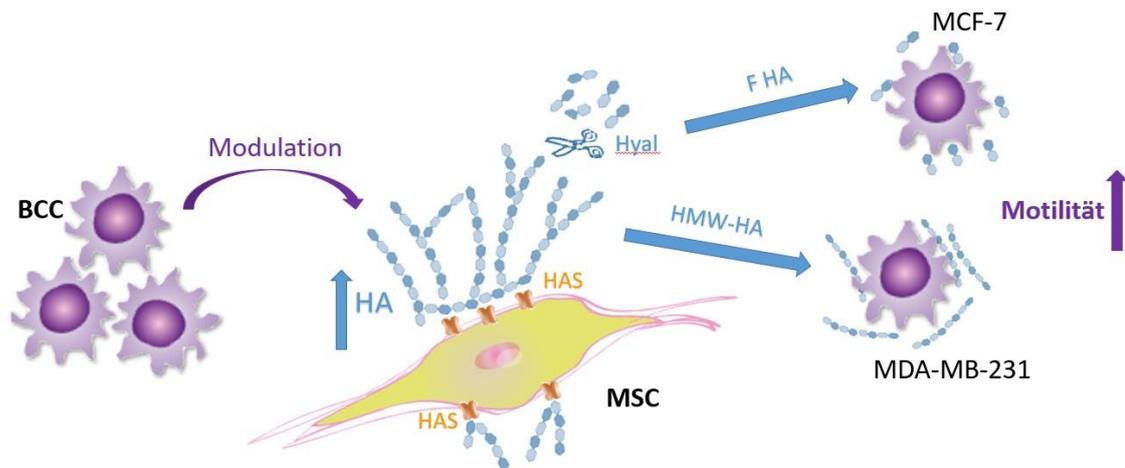


Abb. 15: Schlussfolgerung: Mammakarzinomzellen modulieren die HA-Matrix von MSC und führen zu einem pro-metastatischen Milieu

Lösliche Faktoren von Mammakarzinomzellen (BCC) aktivieren mesenchymale Stammzellen (MSC) und modulieren ihre Hyaluronsäure-Matrix. Durch BCC aktivierte MSC weisen eine erhöhte Synthese von Hyaluronsäure (HA) auf, welche zum Teil durch Hyaluronidasen (Hyal) degradiert wird. Durch die Akkumulation der HA wird ein pro-metastatisches Milieu erzeugt. In diesem Mikromilieu scheinen hochmolekulare HA (HMW-HA) und fragmentierte HA (F-HA) die Motilität von Mammakarzinomzellen unterschiedlich zu beeinflussen. Insgesamt wird die Motilität, sowie Migration durch HA gefördert. (HAS= Hyaluronsäure Synthese)

6 Literaturverzeichnis

1. Łukasiewicz, S., et al., *Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review*. *Cancers* (Basel), 2021. **13**(17).
2. Lacroix, M., *Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13**(4): p. 1033-67.
3. Schneeweiss, A., et al., *Diagnosis and Therapy of Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) - Recommendations for Daily Routine Practice*. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2019. **79**(6): p. 605-617.
4. Satelli, A. and S. Li, *Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(18): p. 3033-46.
5. Kozłowski, J., A. Kozłowska, and J. Kocki, *Breast cancer metastasis - insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2015. **69**: p. 447-51.
6. Fares, J., et al., *Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited*. *Signal Transduct Target Ther*, 2020. **5**(1): p. 28.
7. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889*. *Cancer Metastasis Rev*, 1989. **8**(2): p. 98-101.
8. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 453-8.
9. Kaplan, R.N., S. Rafii, and D. Lyden, *Preparing the "soil": the premetastatic niche*. *Cancer Res*, 2006. **66**(23): p. 11089-93.
10. Liu, Y. and X. Cao, *Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche*. *Cancer Cell*, 2016. **30**(5): p. 668-681.
11. Sanmartin, M.C., et al., *Bone marrow/bone pre-metastatic niche for breast cancer cells colonization: The role of mesenchymal stromal cells*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021. **164**: p. 103416.
12. Friedenstein, A.J., et al., *Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method*. *Exp Hematol*, 1974. **2**(2): p. 83-92.
13. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. *J Orthop Res*, 1991. **9**(5): p. 641-50.
14. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(9): p. 726-36.
15. Horwitz, E.M., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2005. **7**(5): p. 393-5.
16. Kuntin, D. and P. Genever, *Mesenchymal stem cells from biology to therapy*. *Emerg Top Life Sci*, 2021. **5**(4): p. 539-548.
17. Radisky, D.C., *Epithelial-mesenchymal transition*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 19): p. 4325-6.
18. Liu, J., et al., *Mesenchymal stem cells and their microenvironment*. *Stem Cell Res Ther*, 2022. **13**(1): p. 429.
19. Lan, T., M. Luo, and X. Wei, *Mesenchymal stem/stromal cells in cancer therapy*. *J Hematol Oncol*, 2021. **14**(1): p. 195.
20. Suarez-Carmona, M., et al., *EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression*. *Mol Oncol*, 2017. **11**(7): p. 805-823.
21. Mishra, P.J., et al., *Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells*. *Cancer Res*, 2008. **68**(11): p. 4331-9.
22. Ridge, S.M., F.J. Sullivan, and S.A. Glynn, *Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression*. *Mol Cancer*, 2017. **16**(1): p. 31.
23. Jing, Y., et al., *The Role of Mesenchymal Stem Cells in the Induction of Cancer-Stem Cell Phenotype*. *Front Oncol*, 2022. **12**: p. 817971.

24. Peinado, H., et al., *Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(5): p. 302-317.
25. Valenzuela Alvarez, M., et al., *Metastatic Niches and the Modulatory Contribution of Mesenchymal Stem Cells and Its Exosomes*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(8).
26. Kobayashi, T., T. Chanmee, and N. Itano, *Hyaluronan: Metabolism and Function*. Biomolecules, 2020. **10**(11).
27. Garantziotis, S. and R.C. Savani, *Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context*. Matrix Biol, 2019. **78-79**: p. 1-10.
28. Tolg, C., et al., *Hyaluronan Functions in Wound Repair That Are Captured to Fuel Breast Cancer Progression*. Biomolecules, 2021. **11**(11).
29. Erickson, M. and R. Stern, *Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism*. Biochem Res Int, 2012. **2012**: p. 893947.
30. Misra, S., et al., *Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 201.
31. 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.
32. Gentile, P., *Breast Cancer Therapy: The Potential Role of Mesenchymal Stem Cells in Translational Biomedical Research*. Biomedicines, 2022. **10**(5).
33. Kudo-Saito, C., *Cancer-associated mesenchymal stem cells aggravate tumor progression*. Front Cell Dev Biol, 2015. **3**: p. 23.
34. Calabro, A., et al., *Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2578-85.
35. Heldin, P., et al., *HAS2 and CD44 in breast tumorigenesis*. Adv Cancer Res, 2014. **123**: p. 211-29.
36. Lim, E.J., et al., *Tumor-associated mesenchymal stem-like cells provide extracellular signaling cue for invasiveness of glioblastoma cells*. Oncotarget, 2017. **8**(1): p. 1438-1448.
37. Reiprich, S., et al., *Hyaluronan Synthases' Expression and Activity Are Induced by Fluid Shear Stress in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(6).
38. Qu, C., et al., *Extensive CD44-dependent hyaluronan coats on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced by hyaluronan synthases HAS1, HAS2 and HAS3*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **48**: p. 45-54.
39. Duan, Y., et al., *Migration of endothelial cells and mesenchymal stem cells into hyaluronic acid hydrogels with different moduli under induction of pro-inflammatory macrophages*. J Mater Chem B, 2019. **7**(36): p. 5478-5489.
40. Taufalele, P.V., et al., *Matrix stiffness enhances cancer-macrophage interactions and M2-like macrophage accumulation in the breast tumor microenvironment*. Acta Biomater, 2022.
41. Liu, C.M., et al., *Hyaluronan substratum holds mesenchymal stem cells in slow-cycling mode by prolonging G1 phase*. Cell Tissue Res, 2008. **334**(3): p. 435-43.
42. Solis, M.A., et al., *Hyaluronan Induces a Mitochondrial Functional Switch in Fast-Proliferating Human Mesenchymal Stem*. Int J Stem Cells, 2020. **13**(1): p. 151-162.
43. Whiteside, T.L., *Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment*. Semin Immunol, 2018. **35**: p. 69-79.
44. Harrell, C.R., et al., *Mesenchymal Stem Cell: A Friend or Foe in Anti-Tumor Immunity*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(22).

45. Vogeley, C., et al., *The regulatory effect of hyaluronan on human mesenchymal stem cells' fate modulates their interaction with cancer cells in vitro*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 21229.
46. Astachov, L., et al., *Hyaluronan and mesenchymal stem cells: from germ layer to cartilage and bone*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011. **16**(1): p. 261-76.
47. Costa, L.A., et al., *Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses*. *Cell Mol Life Sci*, 2021. **78**(2): p. 447-467.
48. Chowdhury, R., et al., *Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts*. *Oncotarget*, 2015. **6**(2): p. 715-31.
49. Wong, T.Y., et al., *Hyaluronan keeps mesenchymal stem cells quiescent and maintains the differentiation potential over time*. *Aging Cell*, 2017. **16**(3): p. 451-460.
50. Chung, C. and J.A. Burdick, *Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis*. *Tissue Eng Part A*, 2009. **15**(2): p. 243-54.
51. Zhao, Y., J. Gao, and F. Lu, *Human adipose-derived stem cell adipogenesis induces paracrine regulation of the invasive ability of MCF-7 human breast cancer cells in vitro*. *Exp Ther Med*, 2013. **6**(4): p. 937-942.
52. Zakaria, N. and B.H. Yahaya, *Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Growth and Migration of Lung Adenocarcinoma Cancer Cells*. *Adv Exp Med Biol*, 2020. **1292**: p. 83-95.
53. Karnoub, A.E., et al., *Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis*. *Nature*, 2007. **449**(7162): p. 557-63.
54. Zhang, X., et al., *Human colorectal cancer-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through IL-6/JAK2/STAT3 signaling*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(2): p. 25.
55. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
56. Zoltan-Jones, A., et al., *Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(46): p. 45801-10.
57. Porsch, H., et al., *Efficient TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition depends on hyaluronan synthase HAS2*. *Oncogene*, 2013. **32**(37): p. 4355-65.
58. Vitale, D.L., et al., *Targeting the Tumor Extracellular Matrix by the Natural Molecule 4-Methylumbelliferone: A Complementary and Alternative Cancer Therapeutic Strategy*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 710061.
59. Karalis, T.T., et al., *Tumor-suppressive functions of 4-MU on breast cancer cells of different ER status: Regulation of hyaluronan/HAS2/CD44 and specific matrix effectors*. *Matrix Biol*, 2019. **78-79**: p. 118-138.
60. Iwatsuki, M., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(2): p. 293-9.
61. Ma, R., et al., *Mechanisms involved in breast cancer liver metastasis*. *J Transl Med*, 2015. **13**: p. 64.
62. Donelan, W., P.R. Dominguez-Gutierrez, and S. Kusmartsev, *Deregulated hyaluronan metabolism in the tumor microenvironment drives cancer inflammation and tumor-associated immune suppression*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 971278.
63. Liu, M., C. Tolg, and E. Turley, *Dissecting the Dual Nature of Hyaluronan in the Tumor Microenvironment*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 947.
64. Hamilton, S.R., et al., *The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(22): p. 16667-80.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Jens W. Fischer für seine Unterstützung und die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten.

Großer Dank gilt Katharina Gorges, die diese Arbeit durch ihre Ideen vorangebracht hat. Zudem möchte ich mich bei den Mitgliedern der „AG Röck“ Alexandra Schütze, Christian Vogeley und Janna Morawitz für die unterstützende Zusammenarbeit im Labor bedanken. Besonderer Dank gilt Sören Twarock, der mich in den letzten Zügen dieser Arbeit maßgeblich unterstützt hat.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern für ihre unendliche Unterstützung bedanken!