

Aus dem Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie
des Zentrums für experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
(Direktor Prof. Dr. Udo Schumacher)

Dissertation

Verteilung von
Hyaluronan und Kollagen Typ I in humanen Xenografttumoren in
immundefizienten Mäusen

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kristof Gebauer

Hamburg 2015

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 30.06.2016

Veröffentlicht mit der Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof.Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in : Prof. Dr.Andreas Gocht

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	4
2. Einleitung	5
2.1: Aufbau von Tumoren	6
2.2: Tumorstroma	7
2.3: Hyaluronsäure	8
2.4: Kollagen Typ I	11
3. Material und Methode	
3.1. Die Zelllinien	13
3.2. Van Gieson Färbung	16
3.3. spezifische Darstellung von Hyaluronan durch HABP	17
3.4. immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ I	18
3.5. Auswertung der Präparate	19
4. Ergebnisse	
4.1. Pankreaskarzinom der Zelllinien 5072 und 5061	22
4.2. Mammakarzinom der Zelllinien MCF7 und T47D	31
4.3. Prostatakarzinom der Zelllinien PC3 und LNCAP	40
4.4. Kolonkarzinom der Zelllinien HT29 und CaCo2	47
4.5. Bronchialkarzinom der Zelllinien OH1 und OH3	54
4.6. Melanom der Zelllinien MEWO und FemX-1	61
4.7.1. Vergleich der Entitäten	68
4.7.2. Auswertung der Hyaluronan-Intensitäten	70
4.7.3. Auswertung der Typ I Kollagen-Intensitäten	71
4.7.4. Wachstumsdauer und Durchschnittsgewicht	72
4.7.5. Beziehung von Wachstumsgeschwindigkeit und Intensität	73

5. Diskussion	75
6. Zusammenfassung	83
7. Literaturverzeichnis	85
8. Danksagung	90
9. Curriculum vitea	91
10. Eidesstattliche Versicherung	92

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Tumorstroma von malignen Neoplasien rückt immer mehr in das Interesse zur Entwicklung neuer Therapiestrategien. Dabei ist das Wissen um die Zusammensetzung und Interaktion zwischen Tumorzellen, der zellulären und der azellulären Anteilen des Stromas richtungsweisend für die Einschätzung des Therapieerfolges sowie neuer therapeutischer Ansätze. So ist bekannt, dass Tumoren mit einer gesteigerten Produktion von Stromaanteilen einen erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck entwickeln und so eine Barriere für Chemotherapeutika aufweisen können. Kollagen Typ I und Hyaluronan sind zwei wichtige Komponenten der extrazellulären Matrix, denen eine besondere Rolle in der Ausbildung solcher Eigenschaften zugeschrieben werden. So könnte die Inhibition der Bildung dieser Komponenten einen zusätzlichen Vorteil bei der konventionellen Chemotherapie von soliden Tumoren darstellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, semiquantitativ die Lokalisation von Kollagen Typ I und Hyaluronan in Xenografttumoren zu analysieren, um die Frage zu klären, ob es einen signifikanten Unterschied in der Verteilung von Kollagen Typ I und Hyaluronan zwischen den verschiedenen Tumorentitäten gibt. Diese Befunde könnten Aufschlüsse darüber geben, wann manche Tumorentitäten besonders resistent gegen gängige Chemotherapien sind.

2. Einleitung

Krebserkrankungen nehmen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen den zweiten Platz der Todesursachen in Deutschland ein. Nach dem epidemiologischen Krebsregister Deutschland und dem Robert-Koch-Institut erkrankten im Jahr 2008 469.800 Patienten neu an einer Krebserkrankung, während 215.440 Patienten an den Folgen einer Krebserkrankung verstarben (epidemiologisches Krebsregister Deutschland und Robert-Koch-Institut). In Zukunft werden aufgrund des demografischen Wandels und dem damit verbundenen höheren Durchschnittsalters der Bevölkerung, Krebserkrankungen einen immer höheren Stellenwert in der Medizin einnehmen. Um die Therapie von malignen Tumorerkrankungen weiterzuentwickeln, ist das Verständnis der Tumorbiologie unverzichtbar. Nicht nur die Tumorzelle selbst sollte für die Weiterentwicklung von Therapien betrachtet werden, denn Tumoren wurden in den letzten Jahren zunehmend als Organe, deren Komplexität über dem des normalen Gewebes liegen kann, erkannt (Hanahan und Weinberg, 2011).

Neben den Tumorzellen sind eine Reihe von weiteren Zellen und Bindegewebskomponenten an dem Aufbau eines Tumors beteiligt. So finden sich neben Tumorzellen, Endothelzellen, Perizyten, Immunzellen und Fibroblasten, die in einem bindegewebigen Stroma eingebettet sind.

Die Interaktionen zwischen diesen Komponenten stellen potentielle Angriffspunkte für therapeutische Ansätze dar.

2.1 Aufbau von Tumoren

Solide Tumoren bestehen aus zellulären und azellulären Komponenten. Der zelluläre Anteil wird vorwiegend durch Tumorzellen, tumorassoziierte Fibroblasten, Immunzellen, Endothelzellen und Perizyten gebildet. Der azelluläre Anteil, die sogenannte extrazelluläre Matrix, setzt sich aus Fibronectin, Proteoglykanen und fibrillären Kollagenen zusammen (Wagener und Müller, 2010). Um die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu sichern ist das Tumorgewebe mit Arteriolen, Kapillaren und Venolen durchsetzt. Zum Aufbau der Gefäße werden zum Teil Vorläuferzellen aus dem Knochenmark rekrutiert (Peters, 2005). Das System von Blutgefäßen unterscheidet sich von dem des gesunden Gewebes durch eine unorganisierte ungleichmäßige Verteilung. Diese Gefäße sind in ihrem Aufbau verändert. Sie sind unter anderem fenestriert und weisen so eine reduzierte Barrierefunktion auf (Li und Fan, 2007).

Es finden sich, je nach Entität und Größe des Tumors, Nekroseareale die für eine mangelnde Versorgung des Gewebes stehen.

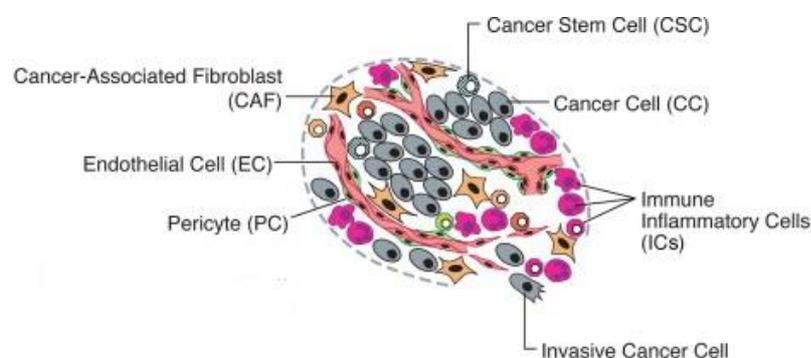


Abb 1: Aufbau von Tumoren und Darstellung der beteiligten Zellen (Quelle: Hanahan und Weinberg, 2011).

2.2 Tumorstroma

Tumorzellen sind in ein bindegewebiges Stroma eingebettet, die eine Reihe verschiedener Zellen wie tumorassoziierte Fibroblasten (TAF), Perizyten, Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen enthält. Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht vorwiegend aus Wasser, Fibronectin, Glykosaminoglykanen (GAG), Proteoglykanen (PG) und fibrillärem Kollagen Typ I und Typ III. Auch die Tumorblutgefäße werden zu dem Tumorstroma gezählt. In der Progression des Tumors übernimmt das Stroma eine entscheidende Rolle. So stimulieren Tumorzellen durch Ausschüttung von tumor growth factor β (TGF- β), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) und vascular endothelial growth Factor (VEGF) die tumorassoziierte Angiogenese durch Fibroblasten, Monozyten und Endothelzellen (Wagner und Müller, 2010).

Die Qualität und Quantität der extrazellulären Matrix unterscheidet sich von den Bindegewebsstrukturen gesunden Gewebes. Es sind die mechanischen Eigenschaften wie Steifigkeit und Passierbarkeit von Molekülen beeinflusst. So produzieren TAF Kollagen zum Aufbau einer dichten extrazellulären Matrix und bilden eine physische Barriere für Effektorzellen und Chemotherapeutika (Li und Fan, 2007). Die Desmoplasie ist definiert als reaktive Vermehrung von Bindegewebe in soliden Tumoren mit ihren Komponenten Typ I, III, V Kollagen, Fibronectin, Laminin, Hyaluronan und Osteonectin. Sie erhöht den interstitiellen Druck, blockieren so die Perfusion und steigern so die Chemoresistenz (Clifford und Haiyong, 2011).

2.3 Hyaluronan

Hyaluronan (HA) ist ein Glykosaminoglykan das aus den Einheiten N-Acetyl-D-glucosamin und D-Glucuronsäure besteht. Die Größenverteilung reicht von wenigen Dissacharideinheiten bis zu 10^5 Dissacharideinheiten.

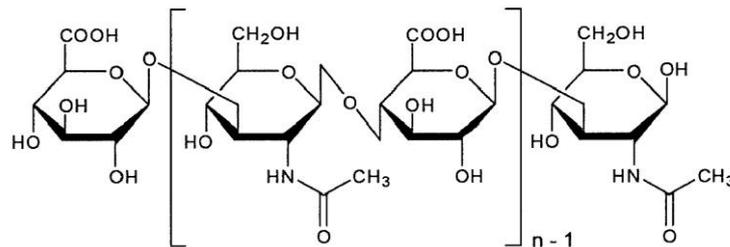


Abb.1: Strukturformel einer Disaccharid-Wiederholungseinheit des Hyaluronan (Quelle: 2014.igem.org)

Die Synthese erfolgt über drei Hyaluroansynthasen (HAS 1-3), die auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert sind. Durch alternierende Übertragung eines UDP-Hyaluronans auf die Substrate UDP-GlcNAc und UDP-GlcUA entstehen langkettige Moleküle (Prehm, 2008).

HAS 1 und HAS 2 produzieren Hyaluronan mit einem Molekulargewicht >500 kDa und HAS 3 Moleküle < 500 kDa (Itano und Kimata, 2002).

Der Transport vom Zytosol in die extrazelluläre Matrix erfolgt über ABC-Transporter. Besonders der MRP5-Transporter wird für den Transport von Hyaluronan aus Fibroblasten verantwortlich gemacht (Schulz et al., 2007).

Auf der Membranaußenseite interagiert der Hyaluronan-Rezeptor CD 44 mit dem extrazellulären Hyaluronan. Der Abbau erfolgt über Hyaluronidasen (HYAL), die die Makromoleküle in kleinere Untereinheiten spalten.

In Tumoren erfolgt der Abbau von hochmolekularem Hyaluronan über HYAL und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu kleineren Fragmenten <500 kDa (Girish und Kemparaju, 2007). Hyaluronan ist ein physiologischer Bestandteil des Bindegewebes und der endothelialen Glykokalyx. Eine Reihe wichtiger biologischer sowie embryonaler Funktionen werden von Hyaluronan beeinflusst. Seine mechanische Funktion besteht vorwiegend aus der Fähigkeit Wasser zu binden, und so den Gewebsturgor des Bindegewebes zu erhöhen. Hochmolekulares, hochvisköses Hyaluronan unterstützt in der Glykokalyx die Barrierefunktion (Furlan und La Penna, 2005). Ein Netzwerk von Hyaluronan, das auf der luminalen Seite des Endothels lokalisiert ist, beteiligt sich zusammen mit der Glycocalyx, Proteoglykanen und Glykolipiden an der Gefäßintegrität (Lennon und Singleton, 2011). In pathologischen Prozessen spielt das Hyaluronan eine zentrale Rolle für die Zellmigration, Expansion von Tumorgewebe und Erhöhung des interstitiellen Drucks in neoplastischen und inflammatorischen Prozessen. So konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Tumorentitäten eine gesteigerte Hyaluronanproduktion mit Angiogenese, Metastasierung und einer schlechten Prognose für den Patienten korreliert (Sironen und Tammi, 2011). Die Untereinheiten des Hyaluronans, die durch die Spaltung durch Hyaluronidasen entstehen, haben Einfluss auf die Angiogenese.

Fragmente zwischen 4 bis 16 Dissachariden stimulieren die Angiogenese, während große Moleküle das Gefäßwachstum dämpfen (West und Kumar, 1989). Die Interaktion von Hyaluronan mit dem membranständigen Hyaluronan-Rezeptor CD44 scheint eine wesentliche Rolle bei der

Transformation, Progression und Metastasierung von Tumoren zu spielen (Willenberg et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von CD44 auf der Oberfläche von Tumorzellen direkt mit der Invasivität und dem metastatischen Verhalten zusammenhängt (Richter et al., 2012). Hochmolekulares Hyaluronan (~ 1 Million Da) bindet an die Standardform des CD44-Rezeptors (CD44s) und verstärkt über eine Kaskade die Zell zu Zell-Kontakte der Endothelzellen und so die Barrierefunktion. Niedermolekulares Hyaluronan (~ 2500 Da) bindet an den CD44-Rezeptor Variante 10 (CD44v10) was zu einer Unterbrechung der Endothelbarriere führt (Singelton et al., 2006). Die Unterbrechung der Endothelbarriere ist ein wichtiger initiierender Schritt in der Angiogenese und Metastasierung von malignen Tumoren (Pardue et al., 2008). Hyaluronanreiches Tumorstroma kann die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MT1-MMP, MMP-2, MMP-7 und MMP-9) stimulieren, welche das Stroma auflockern und so die Zellmigration fördern (Abecassis et al., 2003). Sobald sich die Tumorzellen an einem Gefäß befinden, werden Matrix-Metalloprotease-1(MMP-1), ADAM12 und Tumor-Nekrosefaktor 1 α (TNF1 α) exprimiert um die transendotheliale Migration zu ermöglichen (Mierke, 2011). Durch die vom niedermolekularen Hyaluronan reduzierte Barrierefunktion des Endothels trägt es zu der Intravasation bei (Singelton, 2006). Bei der Extravasation der Tumorzelle in das Zielorgan leistet Hyaluronan einen Beitrag indem sich die Tumorzelle an die hyaluronanreiche Glykokalyx der Endothelzellen anlagert. Die von den Tumorzellen abgegebenen Hyaluronidasen können das hochmolekulare Hyaluronan der Glykokalyx in niedermolekulare

Fragmente abbauen, die die Endothelbarriere unterbrechen können (Singelton, 2014).

2.4. Kollagen Typ I

Als Hauptproduzenten des Kollagens Typ 1 sind Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten zu nennen.

Die Bausteine des Kollagens, das Prokollagen, werden im rauen endoplasmatischen Retikulum gebildet, im Golgi-Apparat in sekretorische Vesikel verpackt und in die extrazelluläre Matrix sezerniert. Im extrazellulären Raum wird durch die enzymatische Reaktion mit Prokollagenpeptidasen Tropokollagen gebildet, das die Untereinheit des Kollagens darstellt.

Die Topokollageneinheiten besteht aus einer Tripelhelix mit der Länge von 300 nm und einem Durchmesser von 1,5 nm. Durch die parallele und versetzte Anordnung der Einheiten entstehen Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von 75 nm. Die Querstreifung der Fibrillen entsteht durch Überlappen und Spalten in der Tropokollagenanordnung.

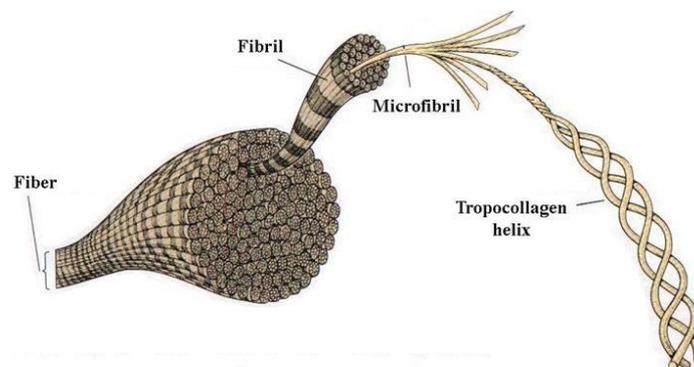


Abb.2: Aufbau von Kollagenfasern (Quelle: Campbell, 1995)

Das häufigste Kollagen ist Kollagen Typ I, das ca. 90% des Körperkollagens ausmacht. Es ist ein wesentlicher Bestandteil des Bindegewebes und beeinflusst seine mechanischen Eigenschaften.

Im Rahmen der Tumorgenese wird das Kollagen Typ I von karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAFs) gebildet (Diop-Frimpong et al., 2010).

In Tumoren kann die Konzentration von Kollagen Typ I gesteigert sein, was die Neoplasien in ihren Eigenschaften deutlich von gesundem Gewebe unterscheidet. Steifigkeit und Minderdurchblutung des neoplastischen Gewebes können Resultate der gesteigerten Kollagen Typ I Synthese sein. Diese Eigenschaften beeinflussen den Erfolg von chemotherapeutischen Ansätzen.

Die Gewebspenetration von Chemotherapeutika mit Größen > 10 nm, ist in fibrotischen Tumoren mit kleinen interfibrillären Räumen herabgesetzt (Netti et al., 2000). Das gesteigerte Diffusionshindernis korreliert mit hohen Anteilen von Kollagen Typ I und der Organisation in Kollagenfibrillen (Pluen et al., 2001).

3. Material und Methode

3.1. Die Zelllinien

Für die Untersuchung wurden 12 verschiedene humane Tumorzelllinien aus sechs verschiedenen Tumorentitäten ausgewählt, die als Primärtumoren im Xenotransplantationsexperimenten in immunsupprimierten Mäusen gewachsen sind.

Für diese Untersuchung wurden Präparate aus dem Archiv des Institutes für experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf herangezogen.

Die verwendete humane Brustkrebszelllinie T47D wurde aus einem Pleuraerguss einer 54-jährigen Frau etabliert, die Brustkrebszelllinie MCF7 wurden aus einem duktalem Adenokarzinom einer 69-jährigen kaukasischen Frau kultiviert (beide stammen aus der europäischen Zellkultur Sammlung (Porton Down, Wiltshire, UK) entnommen),

PC3 und LNCAP sind Prostatakarzinomzelllinien, die aus metastasierenden Adenokarzinomen stammen (beide stammen aus der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DZMZ, Deutschland)). Die Zelllinie CaCo2 und HT29 stammen aus Adenokarzinomen des Dickdarms (Europäische Zellkultur-Sammlung (Porton Down, Wiltshire, UK)).

Die maligne Melanomzelllinien MEWO und FemX-1 wurden aus Lymphknotenmetastasen gewonnen (beide Zelllinien wurden durch die Klinik für Dermatologie (Universität Hamburg Eppendorf, Deutschland) bereitgestellt). OH1 und OH3 sind Zelllinien aus einem kleinzelligen Bronchialkarzinom (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von

Prof. Zangmeister-Wittke Universität Bern, Institut für Pharmakologie). Die Zelllinien 5061 und 5072 entstammen Adenokarzinomen des Pankreas (beide Zelllinien wurden von der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie, Universitätsklinik Hamburg Eppendorf, Deutschland bereitgestellt). Innerhalb der Entitäten wurden fünf Tumoren aus verschiedenen Tieren für die Untersuchung herangezogen.

Nach der Entnahme der Primärtumoren aus den Mäusen wurden diese direkt fixiert und in Paraffin eingebettet, mit dem Mikrotom auf eine Dicke von 5 μm geschnitten, auf Objektträger gezogen und für die immunhistochemischen Färbungen sowie die Trichromfärbung nach Van Gieson, für die Übersichtsdarstellung von Bindegewebsfasern, vorbereitet.

Zelllinie	Entität	Referenz	Quelle
5061	Pankreaskarzinom	Florian Gebauer et al	Klinik für Allgemein-, Visceral- und Thoraxchirurgie Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
5072	Pankreaskarzinom	Florian Gebauer et al.	Klinik für Allgemein-, Visceral- und Thoraxchirurgie Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
T47D	Mammakarzinom	Schumacher U., Adam E.	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
MCF7	Mammakarzinom	Schumacher U., Adam E.	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
PC3	Prostatakarzinom	Lange T. et al	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
LNCAP	Prostatakarzinom	Lange T. et al	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
CaCo2	Kolonkarzinom	Schumacher U., Adam E.	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
HT29	Kolonkarzinom	Schumacher U., Adam E.	Cell lines service (CLS) Deutschland
MEWO	malignes Melanom	Thies A., Schumacher U.	Klinik für Dermatologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
FemX-1	malignes Melanom	Thies A. et al	Klinik für Dermatologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
OH-1	kleinzelliges Bronchialkarzinom	Sodeur S. et al	Zentrum klinische Forschung, Labor für molekulare Onkologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz
OH-3	kleinzelliges Bronchialkarzinom	Sodeur S. et al	Zentrum klinische Forschung, Labor für molekulare Onkologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz

Tabelle 1: Tumorzelllinien mit entsprechenden Tumorentitäten und Referenz

3.2. Van Gieson-Färbung

Die van Gieson Färbung ist eine Dreifachfärbung zur Darstellung von Bindegewebsfasern. Nach dem Entparaffinieren in einer absteigenden Alkoholreihe werden die Präparate mit Eisenhämatoxylin nach Weigert für 5-10 Minuten gefärbt. Eisenhämatoxylin nach Weigert setzt sich aus zwei Lösungen (Lösung A: 1g Hämatoxylin in 100 ml Ethanol 96%, Lösung B: 4ml Eisen(III)-chlorid-Lösung 29% und 1 ml Salzsäure 25% in 95 ml Aqua dest.) zusammen. Es resultiert eine schwarze bis schwarzbraune Färbung der Zellkerne. Es folgt das Entfernen von Überschüssen mit Aqua dest..

Bei zu starker Färbung des Zytoplasmas werden die Schnitte für wenige Sekunden in einer Lösung 0,5% HCL-Ethanol differenziert. Anschließend werden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Beim nächsten Schritt werden die Präparate für 3 Minuten in dem van Gieson Gemisch gefärbt. Das van Gieson Gemisch (Pikrofuchsin) besteht aus 100ml einer gesättigten Pikrinsäurelösung und 5 ml einer wässrigen 1% Säurefuchsinlösung.

Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe werden die Präparate in Xylol fixiert und mit Eukitt eingedeckt.

3.3. Spezifische Färbung von Hyaluronan durch Hyaluronsäure bindendes Protein (HABP)

Die spezifische Darstellung von Hyaluronan erfolgt mittels eines hyaluronbindenden Proteins (HABP). Nach dem Entparaffinieren erfolgt eine Vorbehandlung mit einem modifizierten Citratpuffer (Dako Retrieval Solution S1699[®]) für 12 Stunden bei 60° in einem Wasserbad.

Die Zelllinien 5072, 5061, T47D und MCF7 werden zusätzlich als Spezifitätskontrolle für das Bindungsverhalten von HABP mit Hyaluronidase Typ III und Typ IV für 4 Stunden bei 37° in einer Feuchtkammer inkubiert.

Nach einer Abkühlphase von 20 Minuten wird der Citratpuffer schrittweise durch Aqua dest. und TBS-Puffer verdünnt. Durch die Behandlung mit bovinen Serum Albumin (BSA) werden die unspezifischen Bindungsstellen blockiert, sodass im folgenden Schritt HABP als spezifisches Bindeprotein eingesetzt werden kann. Zur Negativkontrolle werden Präparate mit TBS und BSA behandelt. Nach einer Zeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur werden die Präparate mit TBS gewaschen. Die Farbgebung erfolgt über die Avidin-Biotin-Complex(ABC)Methode. Als Farbstoff dient DAKO liquid permanent Red[®]. Nach der Entwicklung unter mikroskopischer Kontrolle wird die Reaktion unter fließendem Wasser gestoppt. Als Kerngegenfärbung dient Hämalaun. Nachdem die Präparate für 5 Minuten gebläut und 5 Minuten mit Aqua dest. gewaschen wurden, folgt die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe. Abschließend werden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

3.4. Immunhistochemische Färbung Kollagen Typ I

Die Darstellung von Kollagen Typ 1 erfolgt mittels indirekter Antikörperdetektion. Als primärer Antikörper wird ein polyklonaler Antikörper verwendet, der gegen Kollagen Typ I gerichtet ist (polyclonal Rabbit Antibody to Mouse Collagen Type I, Acris BP2201[®]), Schweine-anti-Kaninchen wird als sekundärer Antikörper eingesetzt. Zur Negativkontrolle wird Isotyp Rabbit Ig angewendet. Nach dem Entparaffinieren der Präparate in absteigender Alkoholreihe erfolgt eine Vorbehandlung in einem modifizierten Citrat-Puffer (DAKO Retrieval Solution S1699[®]) bei 100°C für acht Minuten um die Bindungsstelle im Gewebe zu demaskieren. Während der Abkühlungsphase wird das Puffermedium schrittweise durch Aqua dest. verdünnt. Es folgt der Wechsel in TBS-Puffer. Zum Blocken der unspezifischen Bindungsstelle werden die Schnitte mit Schweineserum in TBS für 30 Minuten behandelt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (polyclonal Rabbit Antibody to Mouse Collagen Type I) erfolgt für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Der Antikörper wird in einem Verhältnis von 1:200 in DAKO Antibody Diluent[®] verdünnt. Die Schnitte werden nach der Inkubation für 15 Minuten in TBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Schwein anti- Kaninchen) wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper wird in einem Verhältnis von 1:4000 in DAKO Antibody Diluent[®] verdünnt. Der Nachweis von Kollagen Typ I erfolgt über den Avidin-Biotin-Complex. Die Färbung erfolgt durch die Substratreaktion. Als Farbstoff dient DAKO liquid permanent Red[®]. Hämalaun dient als Kerngegenfärbung. Nach der

Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe werden die Schnitte in Eukitt eingedeckt.

3.5. Auswertung der Präparate

Die Beurteilung der Tumorpräparate erfolgt durch Durchlichtmikroskopie.

Zur Auswertung der Präparate wurden folgende Parameter erhoben.

Die Färbeintensität von Kollagen Typ I und Hyaluronan werden in den Stufen 0-5 klassifiziert. Der Bewertungsmaßstab wird in Tabelle 2 am Beispiel von Hyaluronan dargestellt.

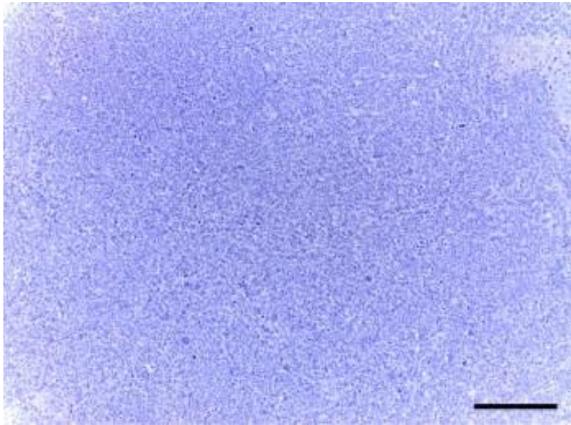
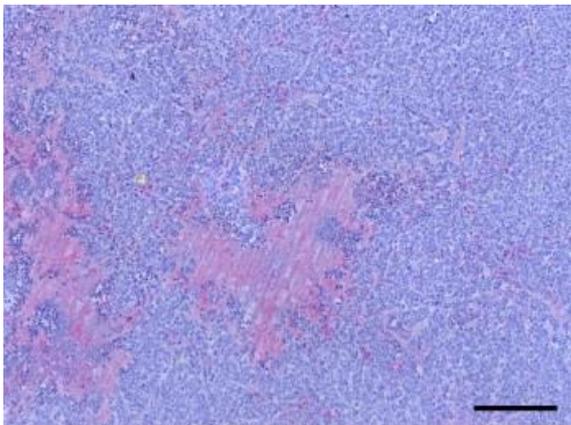
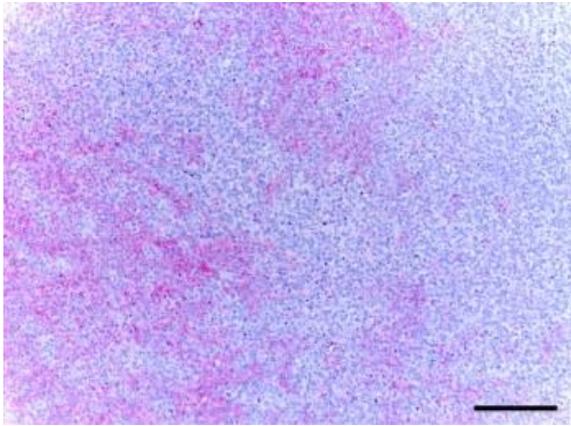
Zur Prüfung von signifikanten Unterschieden der Färbeintensitäten zwischen den Tumorentitäten wurde ein U-Test angewendet.

Die Verteilungen von Kollagen Typ I und Hyaluronan und Nekrose im Gesamtpräparat werden in Prozent (%) bestimmt.

Zusätzlich zur histologischen Beurteilung der Tumoren wurden die Wachstumsdauer und das Gewicht des Primärtumors aus dem OP-Protokoll des Instituts für experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf ermittelt.

Die auf diesem Weg zu bestimmende Wachstumsgeschwindigkeit wird mit den ermittelten Intensitäten von Hyaluronan und Kollagen Typ I in eine Beziehung gesetzt.

Zur Dokumentation und Darstellung wurden die repräsentativen Präparate mit der Axiovision MRc5 (Zeiss) mit den Objektiven 10 X und 40 X aufgenommen. Die statistischen Auswertung und grafischen Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism 5[®]. Die Erhebung der Werte erfolgte durch Beurteilung eines Betrachters.

	Intensität HABP	Beispiele für die Färbeintensität
0	keine Reaktion	<p>A</p> 
1	sehr schwache Reaktion in den vitalen Anteilen	<p>B</p> 
2	schwache Reaktion In den vitalen Anteilen	<p>C</p> 

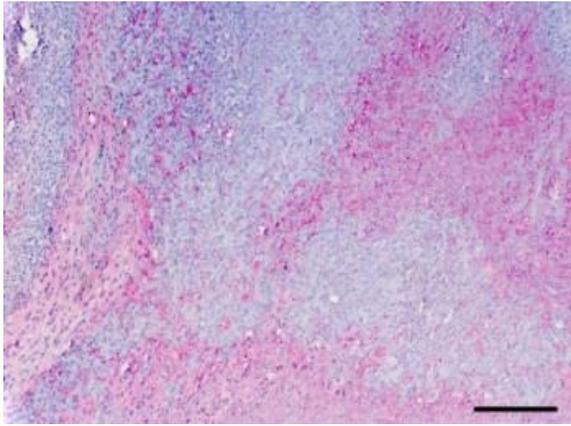
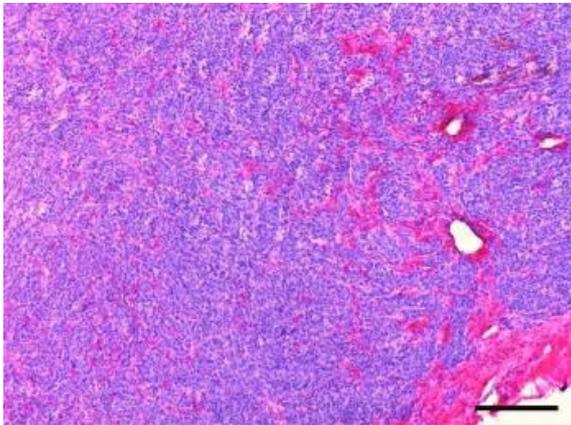
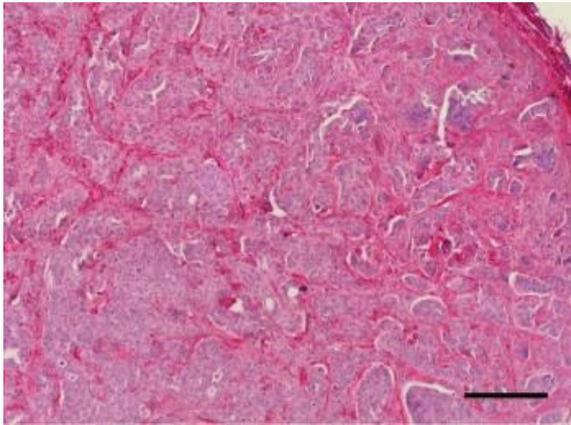
3	mäßige Reaktion In den vitalen Anteilen	D 
4	starke Reaktion In den vitalen Anteilen	E 
5	sehr starke Reaktion In den vitalen Anteilen	F 

Tabelle 2: Bewertungsmaßstab für die Färbeintensität am Beispiel von Hyaluronan A: Bronchialkarzinom OH3, Färbung HABP (Balken 200 µm); B: Bronchialkarzinom OH1, Färbung HABP (Balken 200 µm); C: Prostatakarzinom PC3, Färbung HABP (Balken 200 µm); D: Pankreaskarzinom 5072, Färbung HABP (Balken 200 µm); E: Mammakarzinom T47D, Färbung HABP (Balken 200 µm); F: Mammakarzinom MCF7, Färbung HABP (Balken 200 µm)

4. Ergebnisse

4.1. Primärtumoren der humanen Pankreaskarzinomzelllinien 5072 und 5061

Die Analyse, der in Mäusen gewachsenen Primärtumoren der Zelllinien 5072 und 5061, zeigen eine durchschnittliche Hyaluronan Intensität von 1,8 (siehe Abb. 3). Die durchschnittliche Färbeintensität von Hyaluronan im Nekrosebereichen ist deutlich höher als die Intensität in den vitalen Tumorbereichen. Die Nekroseareale nehmen durchschnittlich 24% des Präparates ein. Die Übergänge zum murinen Gewebe zeigen wie die Nekrosezonen eine starke Färbeintensität von Hyaluronan. Das Pankreaskarzinom der Zelllinien 5072 zeigt eine geringfügig stärkere Färbeintensität von Hyaluronan. Die Verteilung von Hyaluronan in den vitalen Tumorarealen ist bei beiden Pankreastumoren vergleichbar. Die beiden Pankreaskarzinome weisen gleiche Färbeintensitäten von drei bei Kollagen Typ I auf, die Zelllinie 5061 hat eine höhere Verteilung von Kollagen Typ I als die Zelllinie 5072 im Gesamtpräparat.

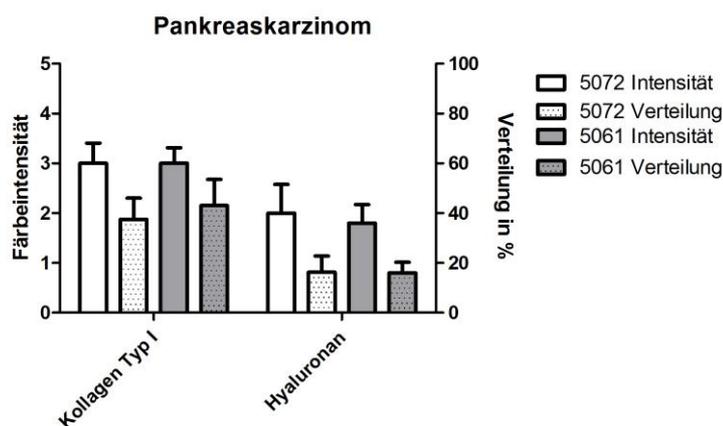
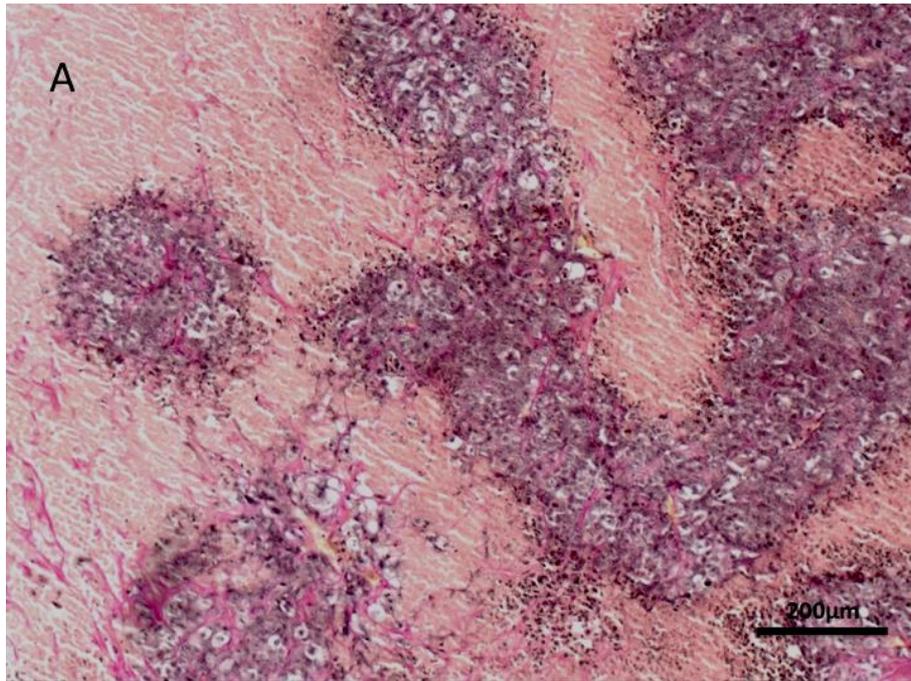


Abb 3: Färbeintensitäten von Kollagen Typ I und Hyaluronan mit den Verteilung im Gesamtpräparat. Die Zelllinie 5072 zeigt eine geringfügig stärkere Färbeintensität von Hyaluronan, die Zelllinie 5061 eine erhöhte Verteilung von Kollagen Typ I im Präparat.

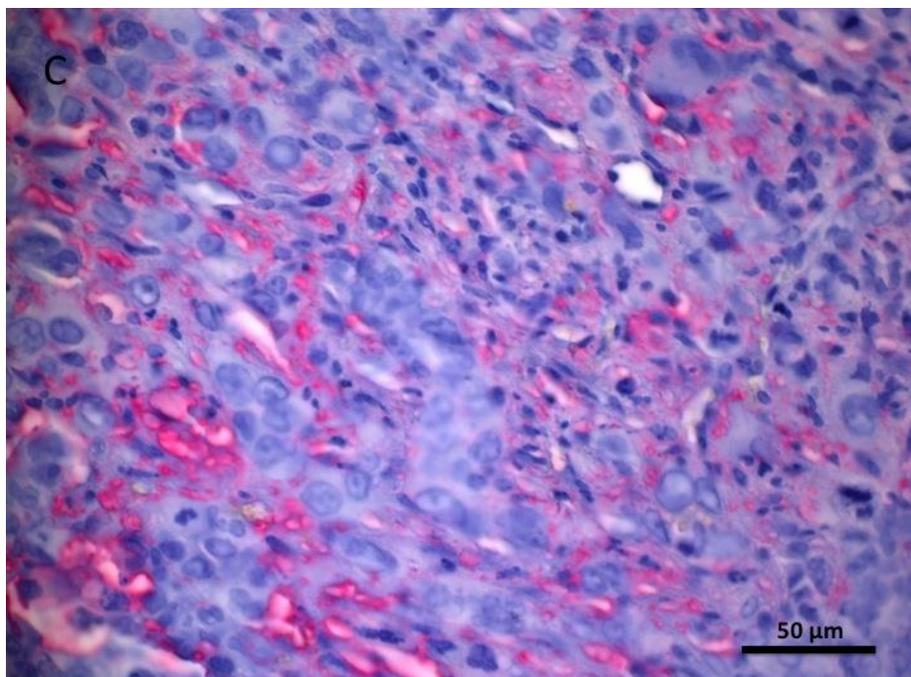
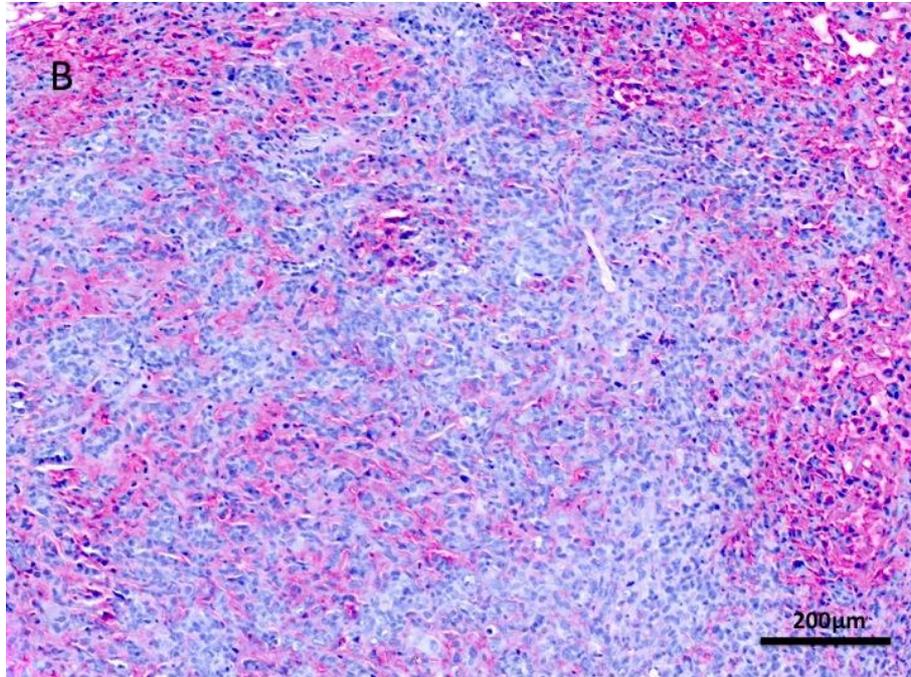
Abb 4: Primärtumor der humanen Pankreaskarzinomzelllinie 5072 in der Scid-Maus gewachsen.

A: van Gieson Färbung. Das faserreiche Bindegewebe ist rot dargestellt, die Nekrosebereiche gelb. Da keine Drüsenstrukturen zu erkennen sind, handelt es sich um einen undifferenzierten Tumor.



B: Darstellung von Hyaluronan in einem Pankreaskarzinom der Zelllinie 5072, Die Nekrosebereiche zeigen eine hohe Konzentration, die zellulären Anteile einen geringeren Anteil von Hyaluronan

C: Das Hyaluronan in einem Pankreaskarzinom 5072 zeigt sich in die interzellulären Räumen.



D: Spezifische Darstellung von Kollagen Typ I in einem Pankreaskarzinom der Zelllinie 5072. Es finden sich Kollagensepten, die sich sowohl durch die Nekrosebereiche, wie auch durch die zellulären Tumorregionen erstrecken.

E: Die Anordnung des Kollagen Typ I in dem Pankreaskarzinom 5072 ist in der Vergrößerung auch als interzelluläre Septen zu erkennen.

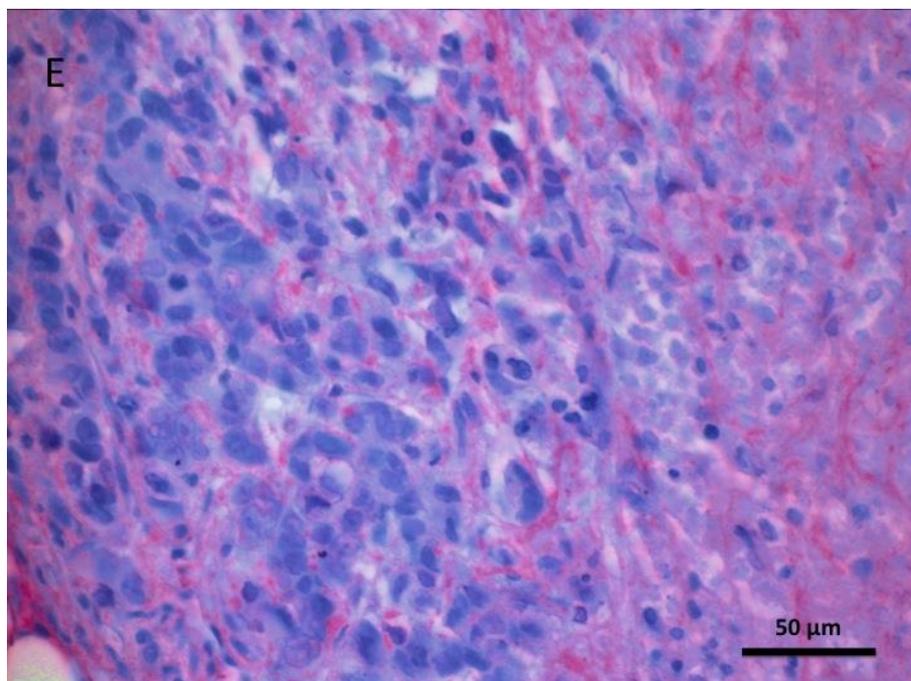
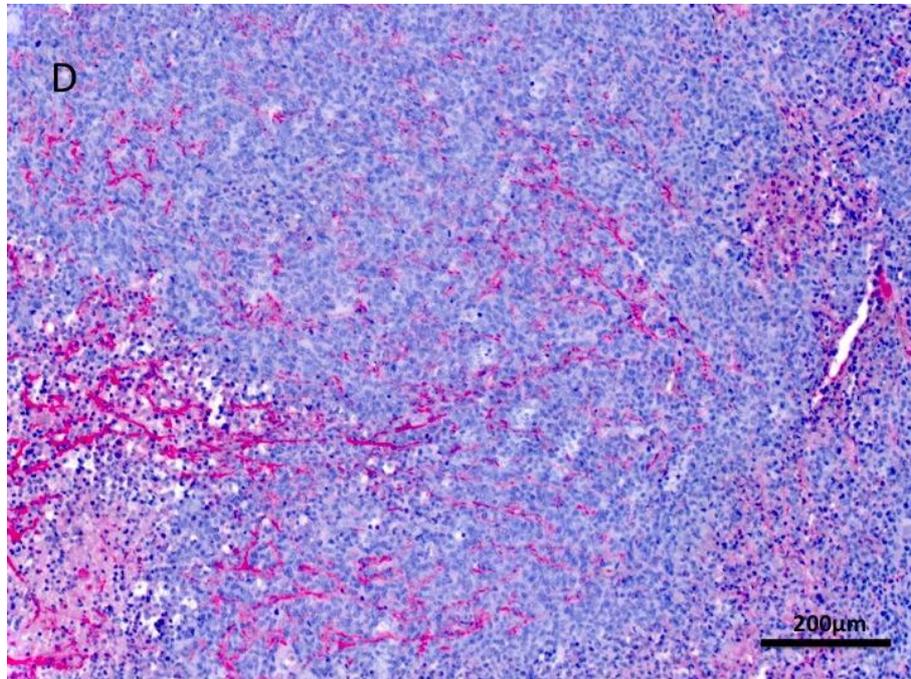
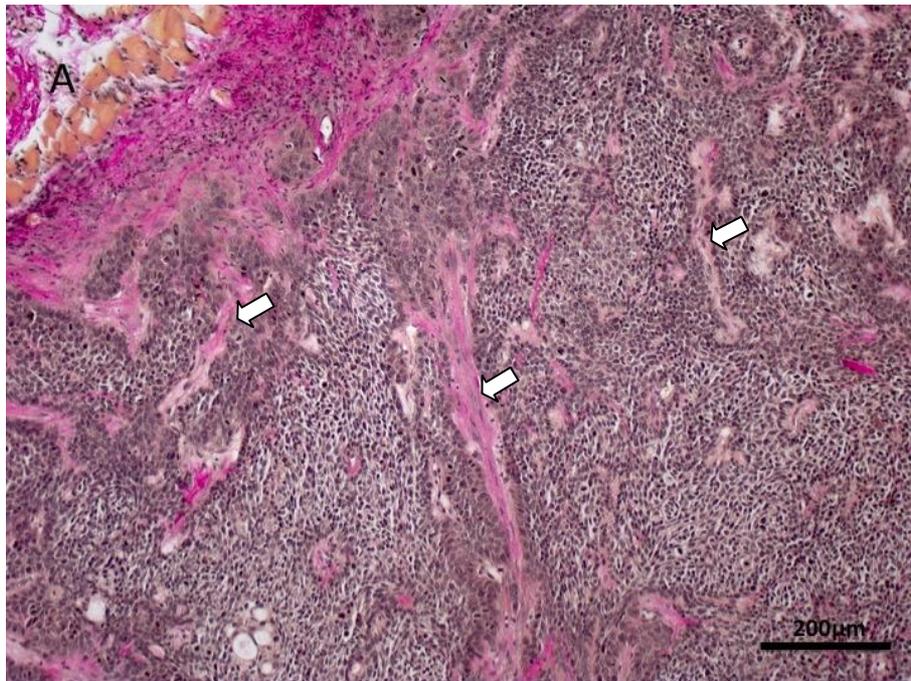


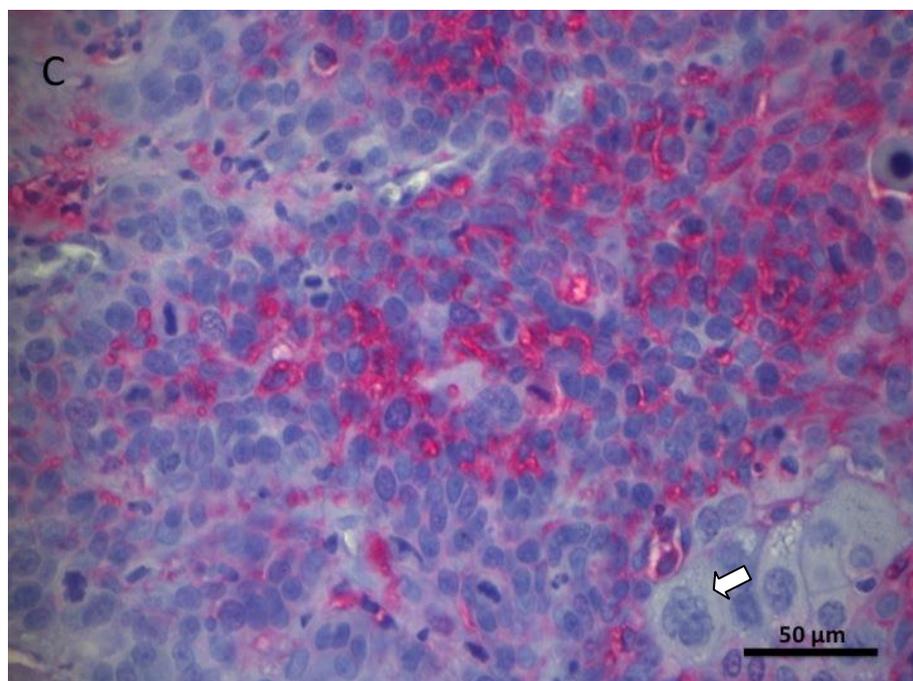
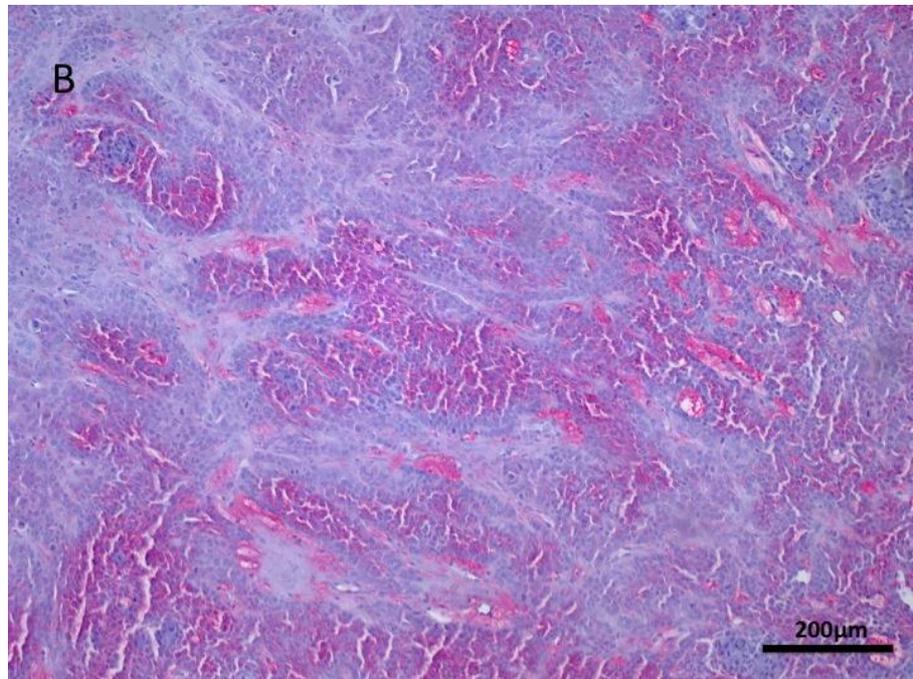
Abb 5: Primärtumore der humanen Pankreaskarzinomzelllinie 5061 in der Scid-Maus gewachsen.

A: Darstellung des Bindegewebes durch van Gieson Färbung eines Pankreaskarzinoms 5061. Im oberen linken Bildabschnitt zeigt sich der Übergang zum murinen Gewebe. Ausgeprägte Bindegewebssepten (Pfeile) durchziehen den Tumor.



B:Das Hyaluronan im Pankreaskarzinom 5061 zeigt sich deutlich abgelagert in den Nekrosezonen.

C:Pankreaskarzinom 5061. Interzelluläre Darstellung von Hyaluronan. Im unteren rechten Bildabschnitt zeigen sich Riesenzellen(Pfeil) mit Kernpolymorphien.



D: Kollagen Typ I findet sich bevorzugt in den Septen des Pankreaskarzinoms 5061. Die Nekrosebereiche (Pfeile) zeigen weniger Kollagendeposition.

E: Pankreaskarzinom 5061. Kollagen Typ I wird in den Bindegewebssepten nachgewiesen.

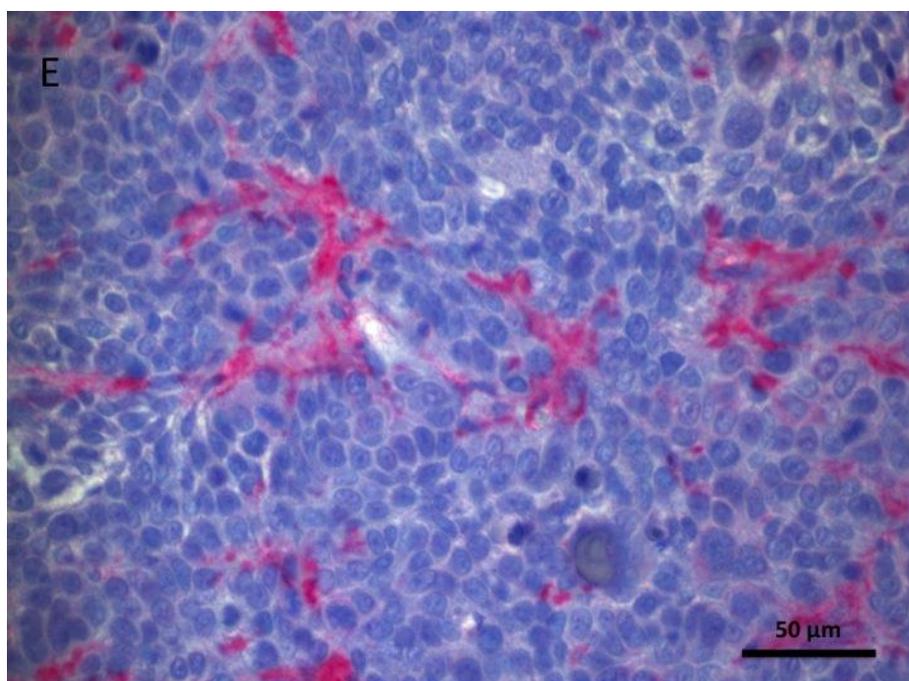
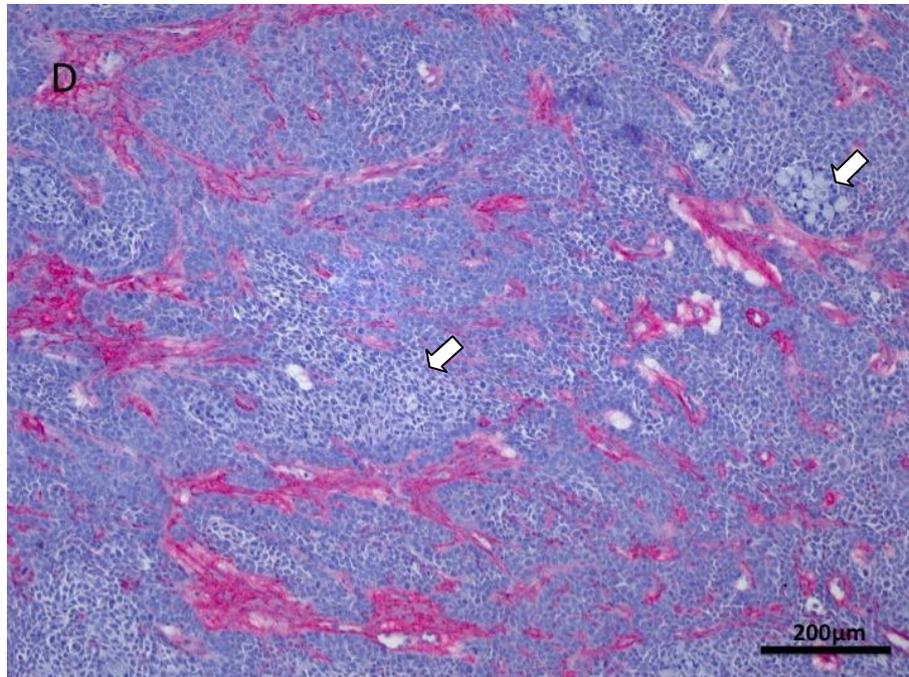
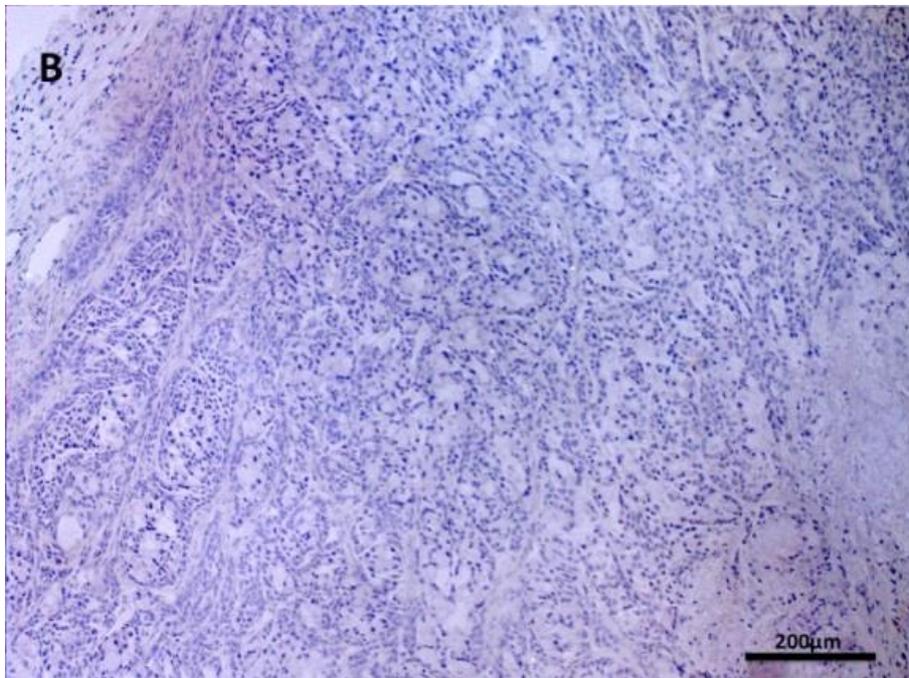
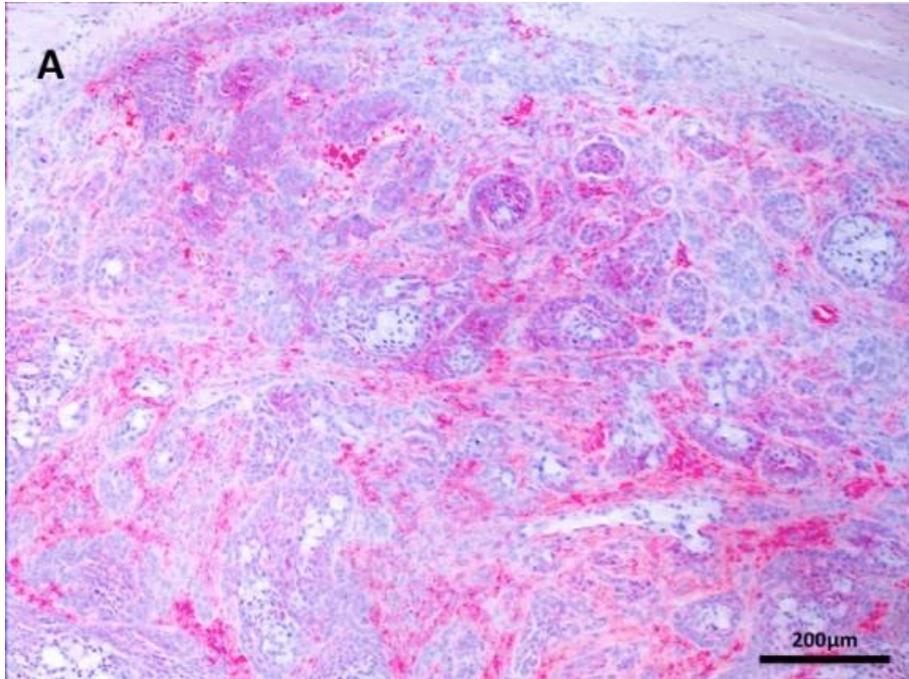
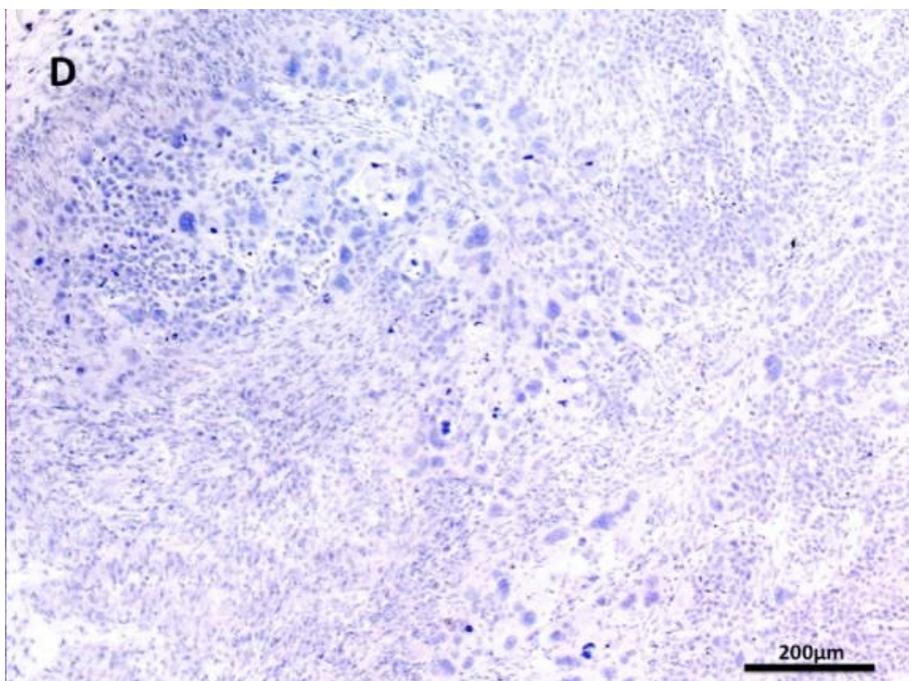
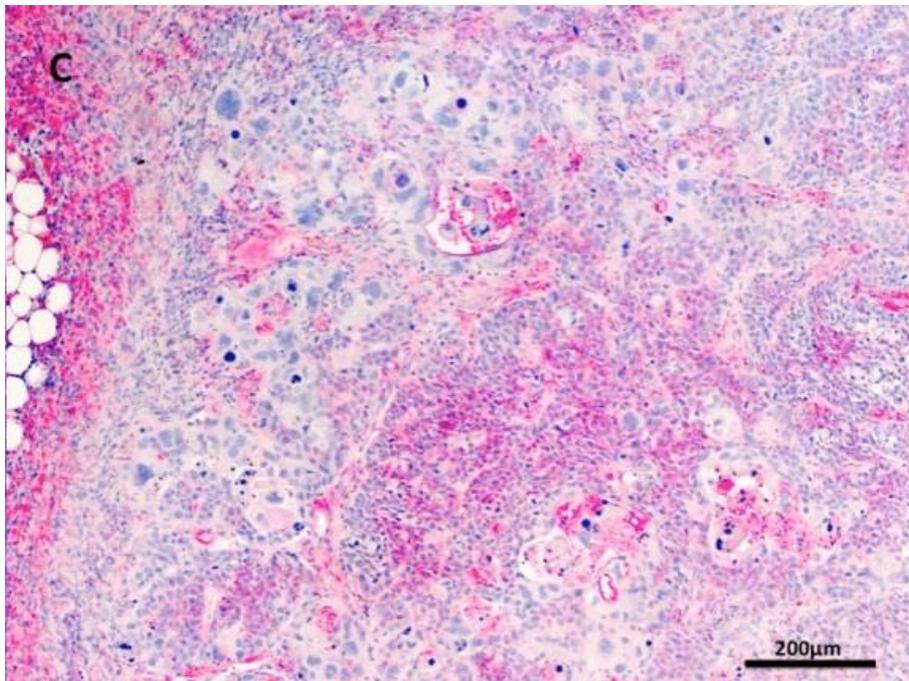


Abb 6: Negativkontrolle des Pankreaskarzinoms 5061

A: Pankreaskarzinom 5061 Färbung HABP. **B:** Pankreaskarzinom 5061 Negativkontrolle durch Verdauung mit Hyaluronidase.



C: Pankreaskarzinom 5061 Färbung HABP. **D:** Pankreaskarzinom 5061
Negativkontrolle durch Verdauung mit Hyaluronidase.



4.2. Primärtumore der humanen Mammakarzinomzelllinien MCF7 und T47D

Die Analyse der Zelllinien MCF7 und T47D zeigt eine gleichwertige Färbeintensität von Hyaluronan wobei das Mammakarzinom MCF7 eine geringfügig höhere Färbeintensität aufweist (siehe Abb 7). Die Intensität von Hyaluronan in den Nekrose- und Randzonen zeigt eine deutlich gesteigerte Reaktion im Vergleich zum vitalen Tumorgewebe. Die Verteilung von Hyaluronan in den vitalen Arealen liegt durchschnittlich bei 20 %, wobei die Zelllinien T47D einen höheren Anteil an Hyaluronan positiven Bereichen im Gesamtpräparat aufweist. Nekrosezonen nehmen durchschnittlich 22,2% des Gesamtpräparates ein. Die Färbeintensität für Kollagen Typ I liegt bei 2,78, wobei die Zelllinie T47D eine höhere Färbeintensität aufweist. Auch die Verteilung von Kollagen Typ I ist in der Zelllinie T47D mit durchschnittlich 54% gegenüber der Zelllinie MCF7 mit durchschnittlich 29% deutlich erhöht.

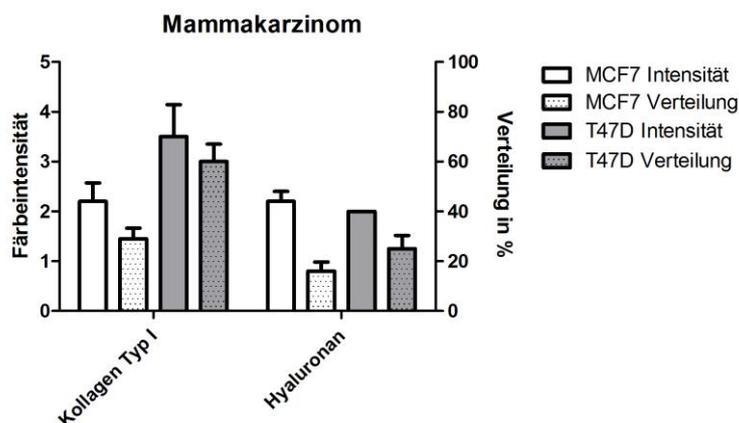
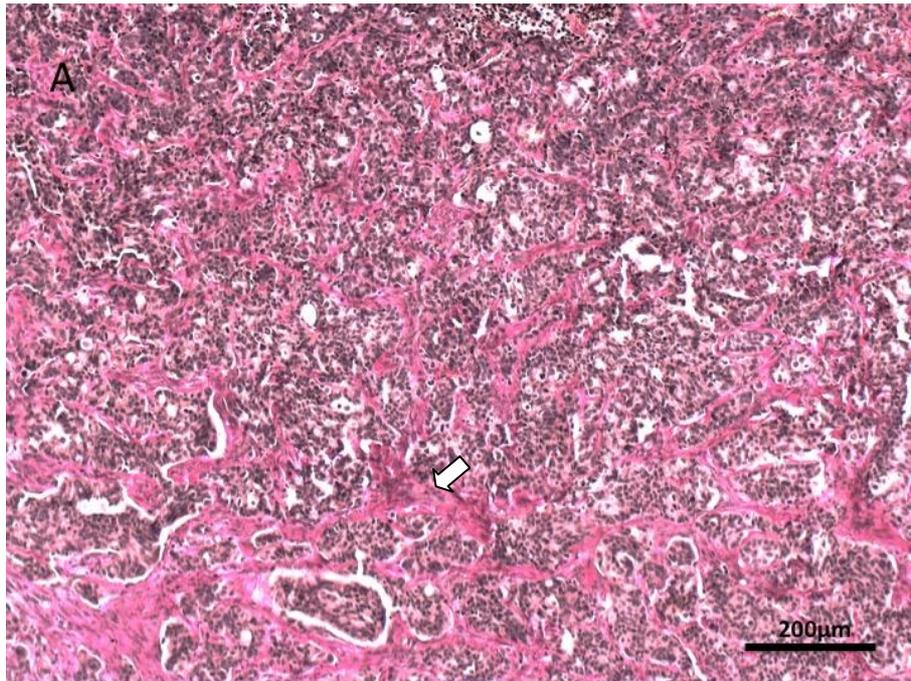


Abb 7: Färbeintensitäten und Verteilung von Kollagen Typ I und Hyaluronan in den Mammakarzinomen MCF7 und T47D. Die Zelllinie T47D weist eine deutlich stärkere Färbeintensität und Verteilung von Kollagen Typ I auf.

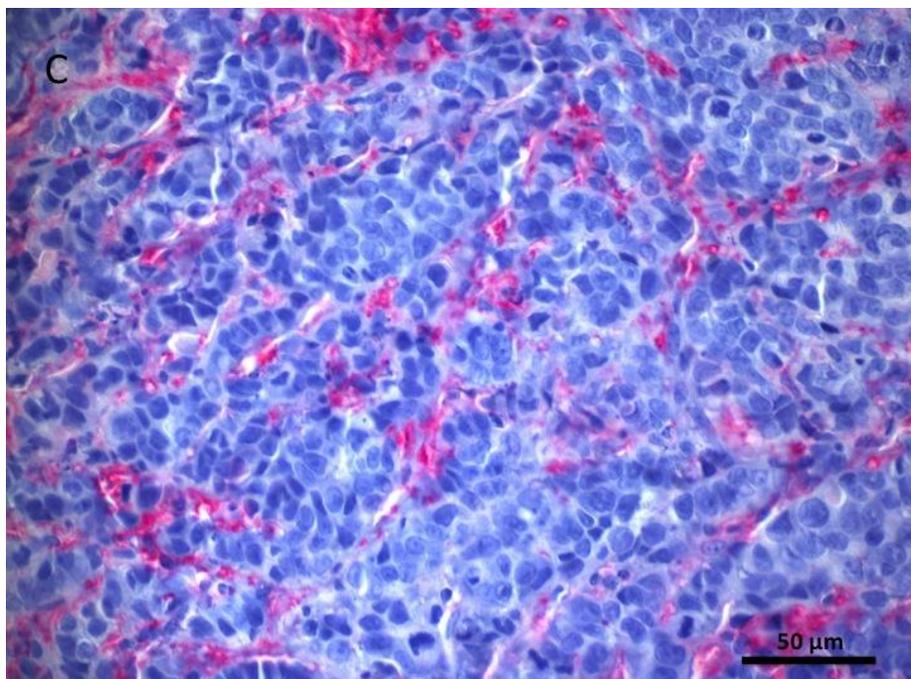
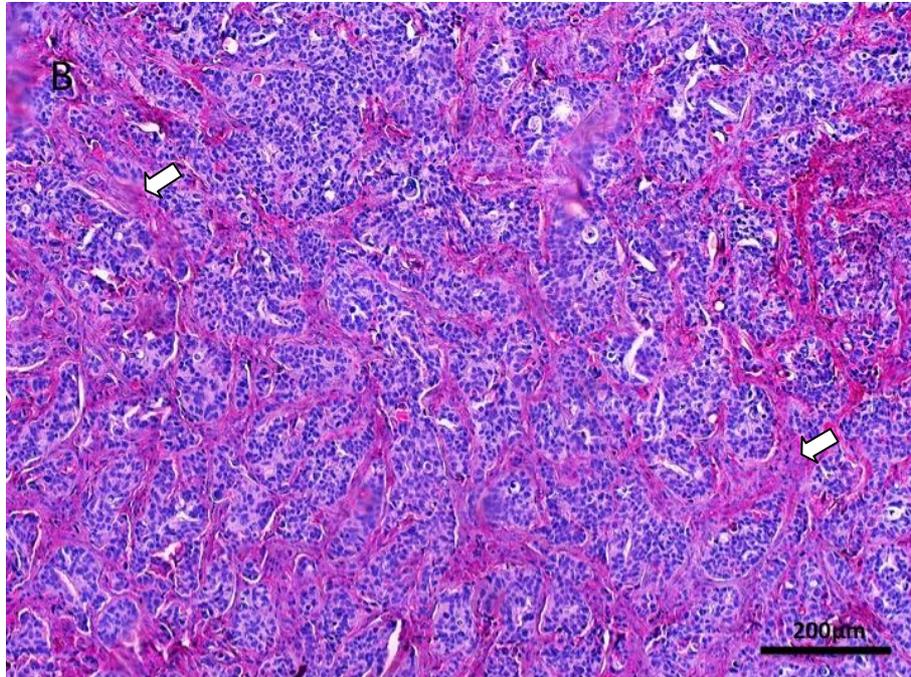
Abb 8: Primärtumor der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF7 in der Scid-Maus gewachsen

A:Die van Gieson Färbung zeigt eine ausgeprägte Septierung des Mammakarzinoms MCF7. Die fasereichen Septen sind rot dargestellt (Pfeil). Das histologische Bild entspricht dem eines medullären Karzinoms mit ausgeprägten Tumorzellinseln, die von den erwähnten Septen unterteilt werden.



B:Das Mammarzinom MCF7 zeigt eine deutliche Intensität von Hyaluronan in den Septen(Pfeile) und eine abgeschwächte Intensität in den zellulären Bereichen des Präparates.

C:Mammakarzinom MCF7, Darstellung von Hyaluronan in feinen Septen, die die Tumorzellinseln durchziehen.



D:Das Mammakarzinom MCF7 zeigt eine sehr intensive Färbung von Kollagen Typ I, wobei die Septen eine hohe Intensität aufweisen.
E:Mammakarzinom MCF7, Darstellung von Kollagen Typ I in Septen.

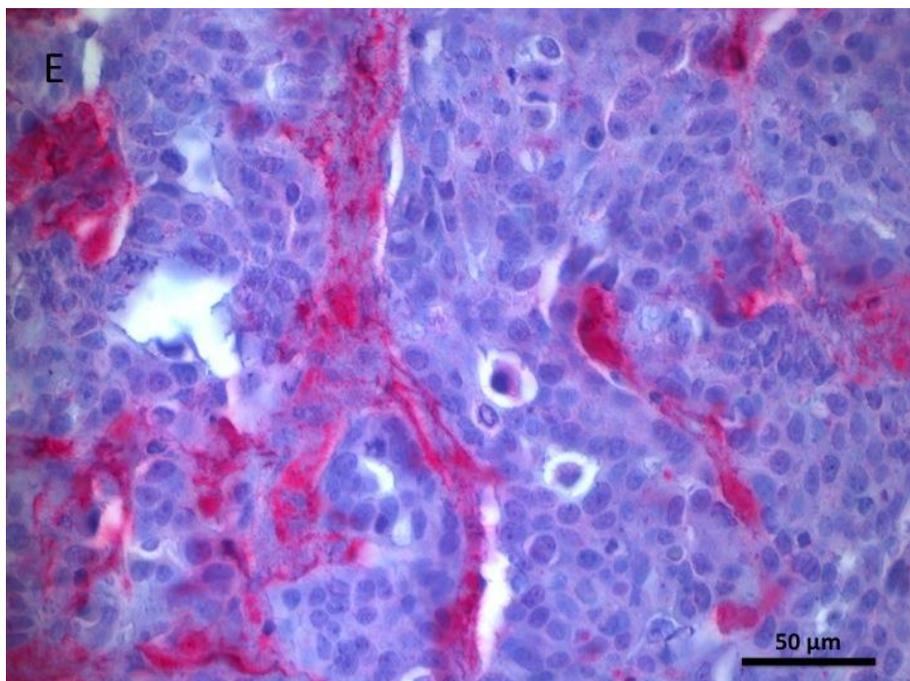
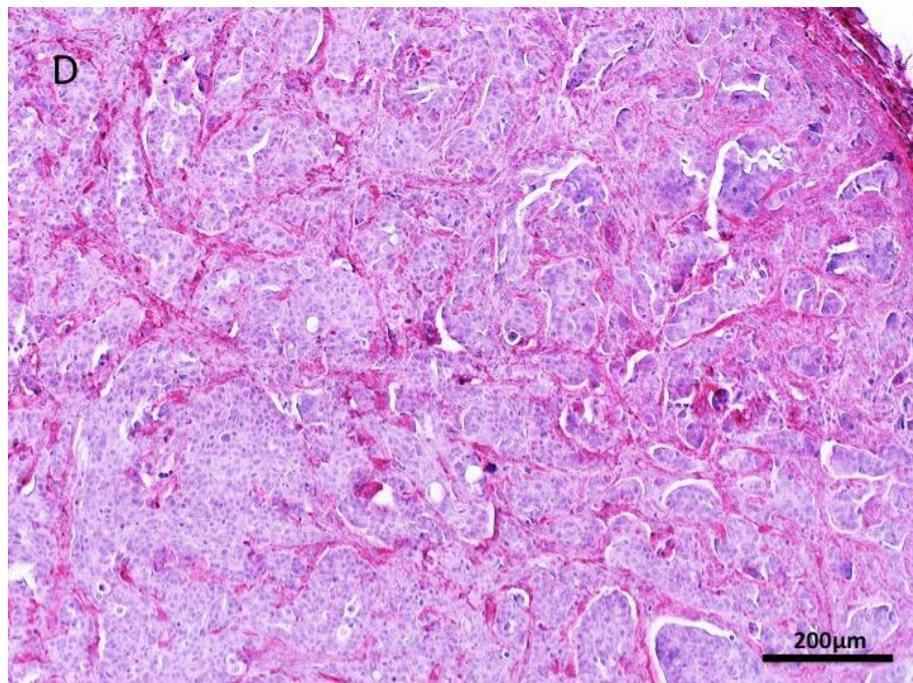
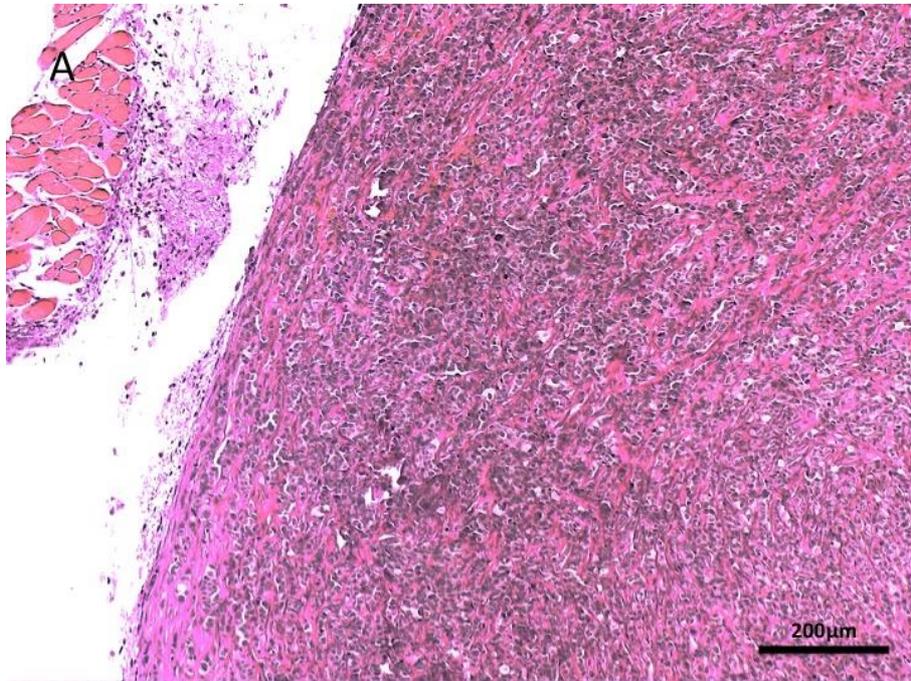


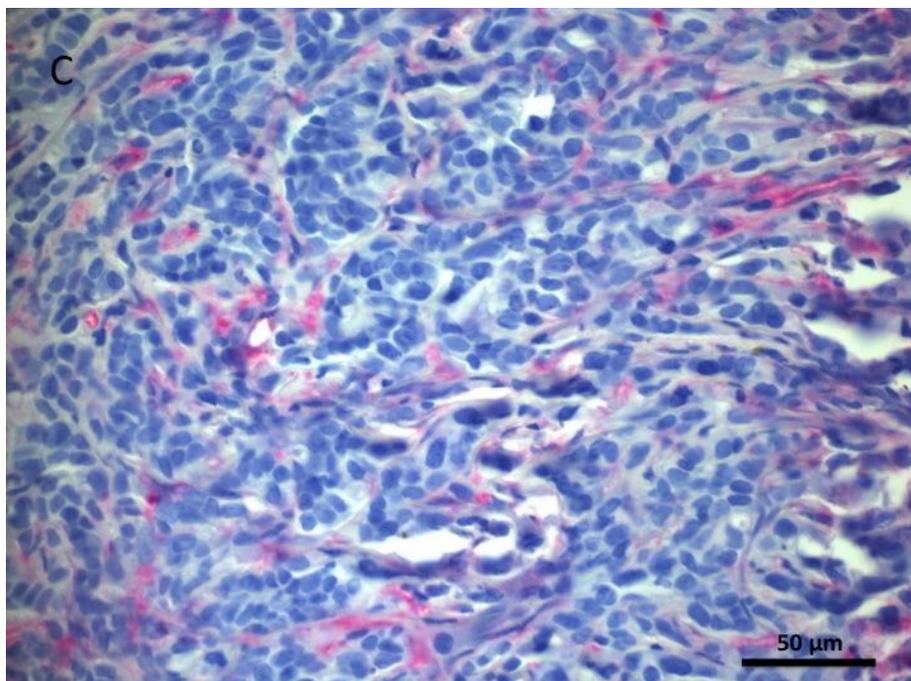
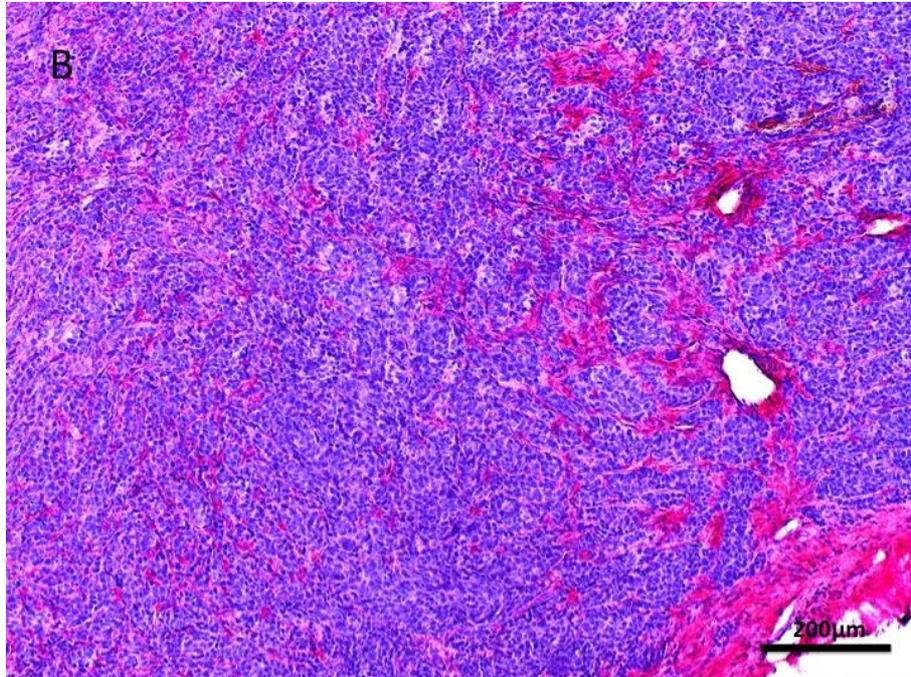
Abb 9: Primärtumor der humanen Mammakarzinomzelllinie T47D in der Scid-Maus gewachsen.

A: Van Gieson Färbung eines Mammakarzinoms der Zelllinie T47D. Ausgeprägte Bindegewebsseptierung, die die Tumorzellinseln unterteilen und so die Struktur eines medullären Karzinoms ergeben.



B: Darstellung von Hyaluronan in einem Mammakarzinoms T47D. Die Septen zeigen einen deutlichen Anteil von Hyaluronan. Im linken unteren Bildausschnitt stellt sich murines Gewebe dar.

C: Mammakarzinom T47D, das Hyaluronan ist in feinen Septen lokalisiert die die Tumorzellinseln durchziehen.



D:Das Mammakarzinom T47D zeigt eine sehr starke Intensität von Kollagen Typ I.

E:Mammakarzinom T47D, hohe interzelluläre Intensität der Immunreaktivität von Kollagen Typ I.

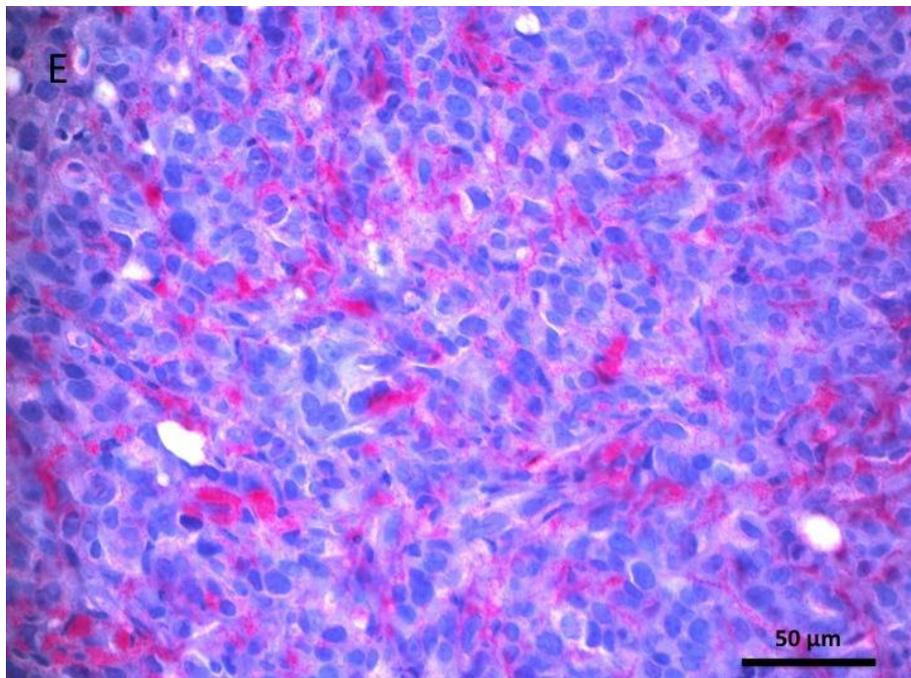
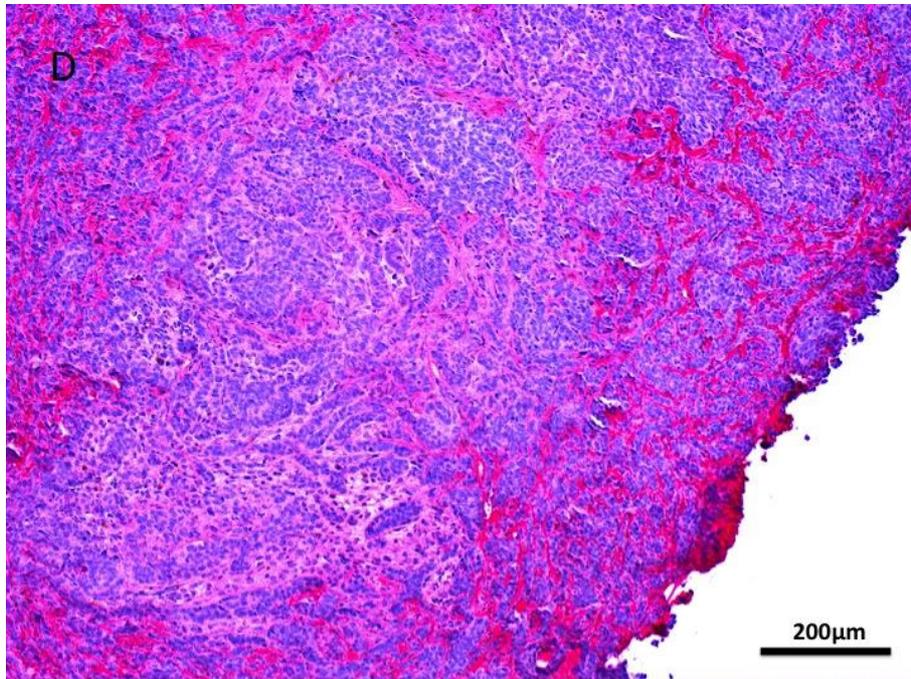
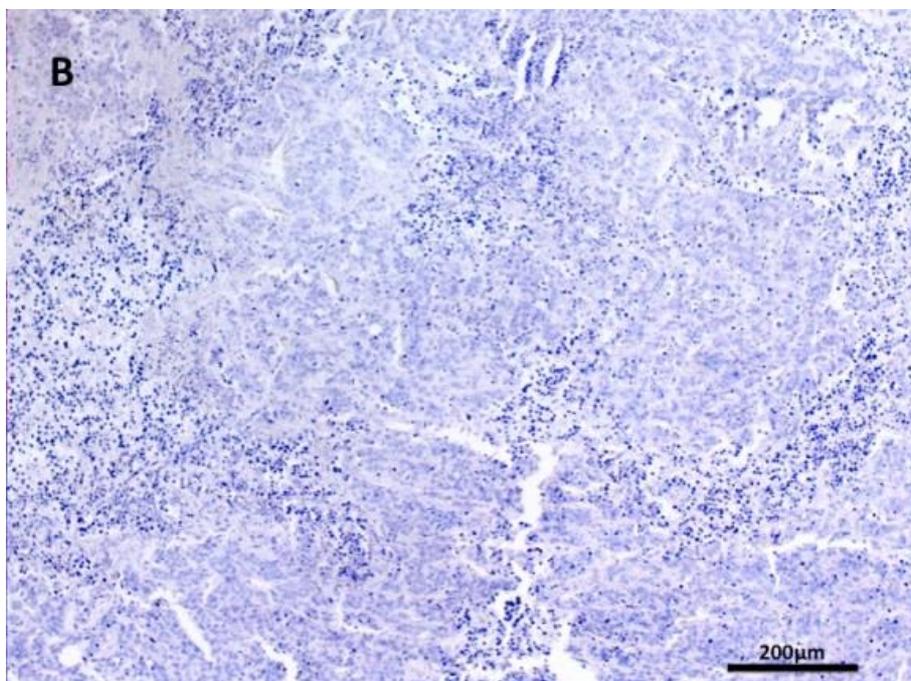
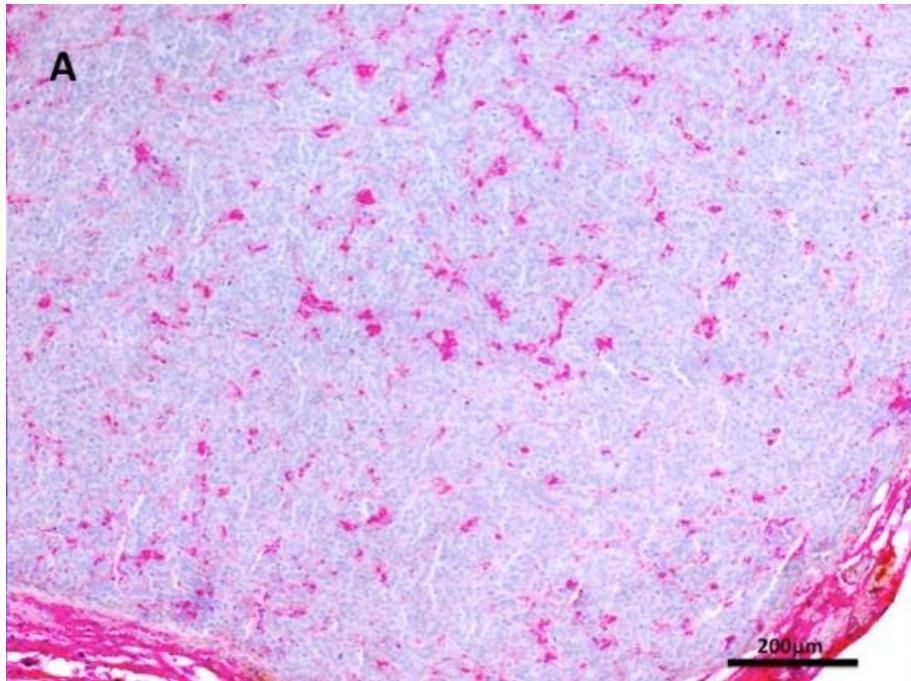
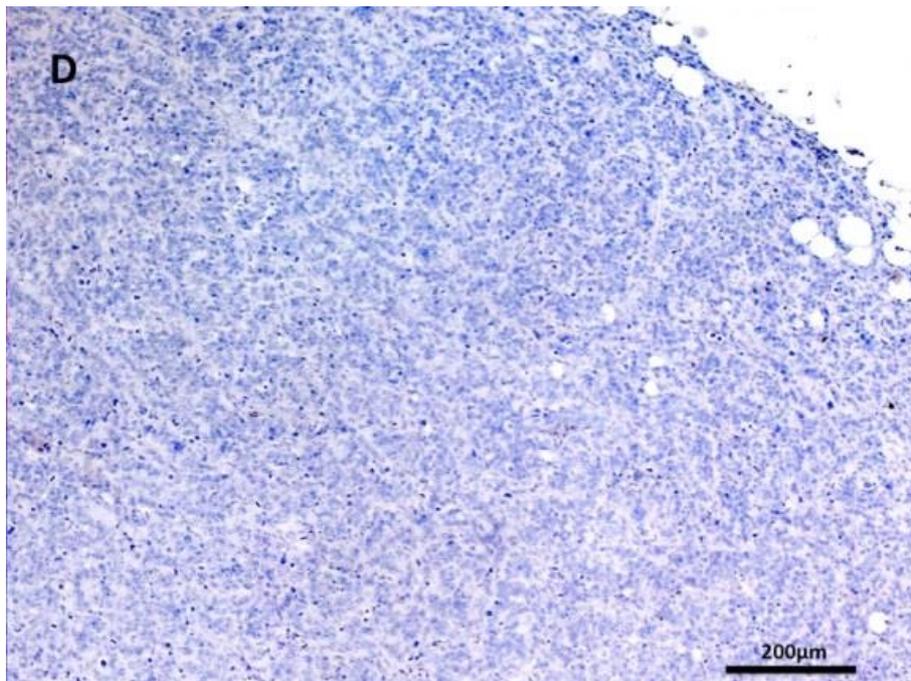
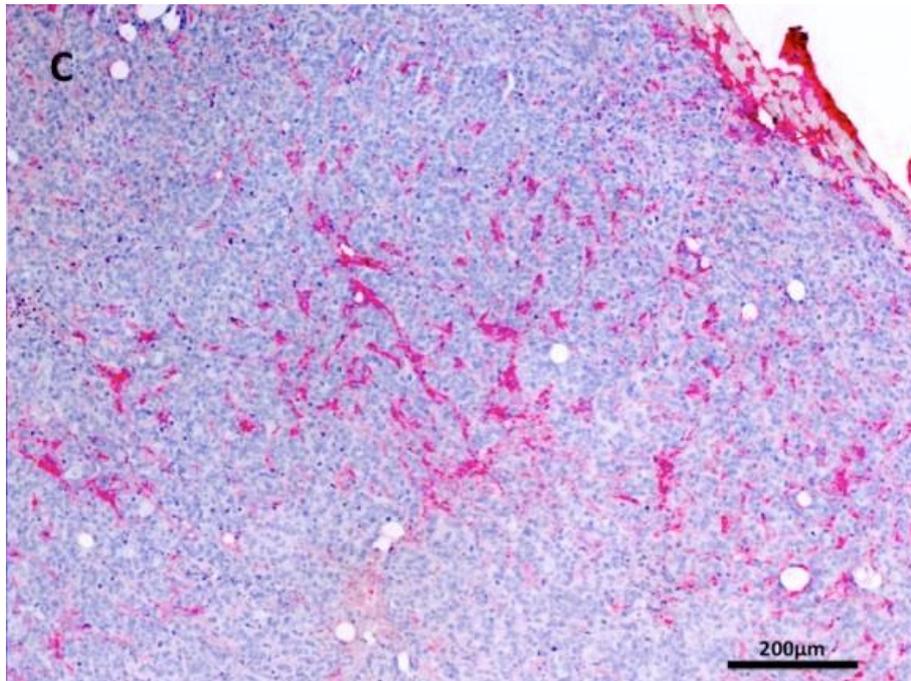


Abb 10:Negativkontrolle des Mammakarzinoms MCF7

A:Mammakarzinom MCF7 Färbung HABP. **B:**Mammakarzinom MCF7
Negativkontrolle durch Verdauung mit Hyaluronidase.



C:Mammakarzinom MCF7 Färbung HABP. **D:**Mammakarzinom MCF7
Negativkontrolle durch Verdauung mit Hyaluronidase.



4.3. Primärtumore der humanen Prostatakarzinomzelllinien PC3 und LNCAP

Die Intensität von Hyaluronan in den Zelllinien PC3 liegt bei durchschnittlich 1, in der Zelllinie LNCAP bei 0,75. Die Tumoren der Zelllinien PC3 haben einen höheren Hyaluronan-positiven Anteil im Gesamtpräparat als die Zelllinie LNCAP.

Die Färbeintensität von Kollagen Typ I ist in den Zelllinien PC3 und LNCAP annähernd vergleichbar. Die Verteilung von Kollagen Typ I liegt durchschnittlich bei 17%, wobei die Zelllinie PC3 auch hier einen geringfügig höheren Anteil von 19% erreicht.

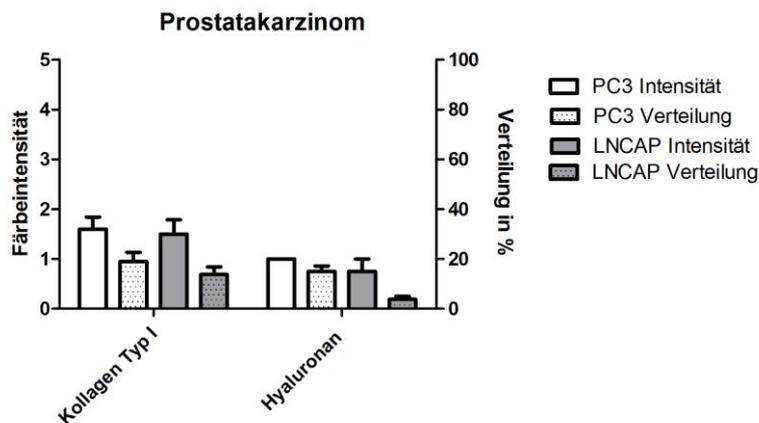
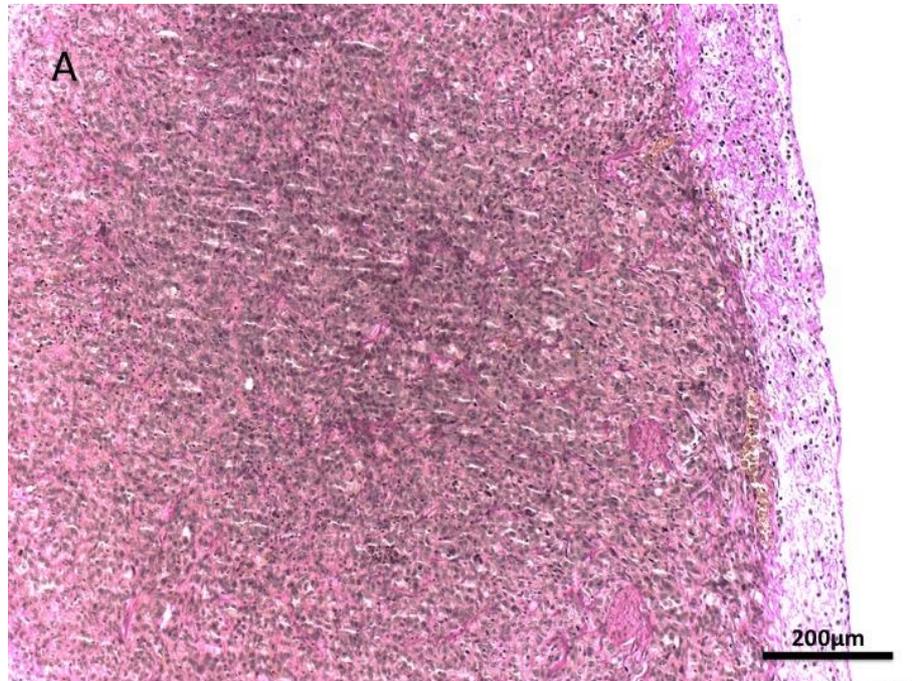


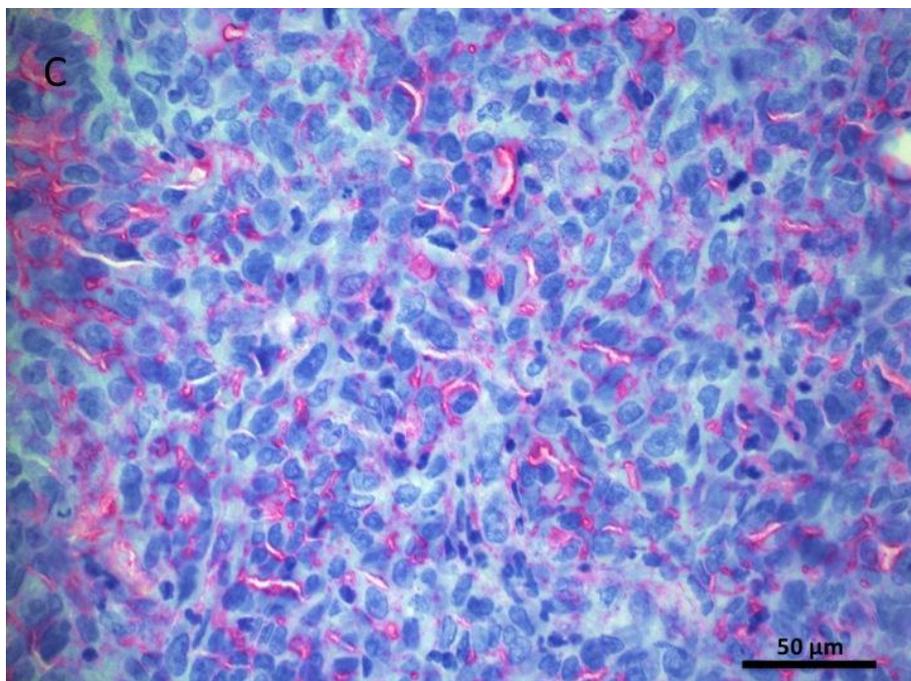
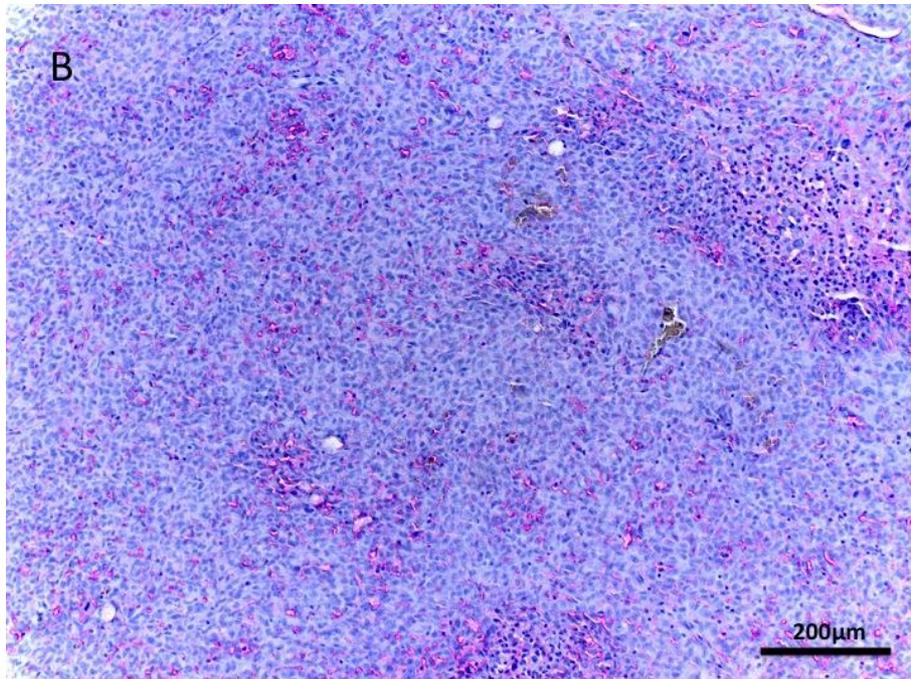
Abb 11: Färbeintensitäten und Verteilung von Kollagen Typ I und Hyaluronan in den Prostatakarzinomen PC3 und LNCAP. Die Färbeintensität und Verteilung von Kollagen Typ I weist nur marginale Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien auf. Die Verteilung von Hyaluronan in der Zelllinie LNCAP ist deutlich geringer als die der Zelllinie PC3.

Abb 12: Primärtumor der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC3 in der Scid-Maus gewachsen.

A: van Gieson Färbung eines Prostatakarzinoms PC3. Der Randbereich zeigt eine murine bindegewebige Kapsel. Das Fehlen von Drüsenlichtungen lässt auf eine solide Variante schließen. Die dichte, zelluläre Struktur wird von feinen bindegewebigen Septen durchsetzt.



B:Das Prostatakarzinom PC3 zeigt eine schwache Intensität von Hyaluronan, die sich im Bereich von Nekrosen erhöht.
C:Interzelluläre Darstellung von Hyaluronan in einem Prostatakarzinom PC3.



D:Das Prostatakarzinom PC3 zeigt eine moderate Intensität von Kollagen Typ I in den Bindegewebssepten und schwache Reaktion in den zellulären Anteilen.

E:Pankreaskarzinom PC3, Darstellung von Kollagen Typ I, das in feinen Septen die vitalen Tumoranteile durchzieht.

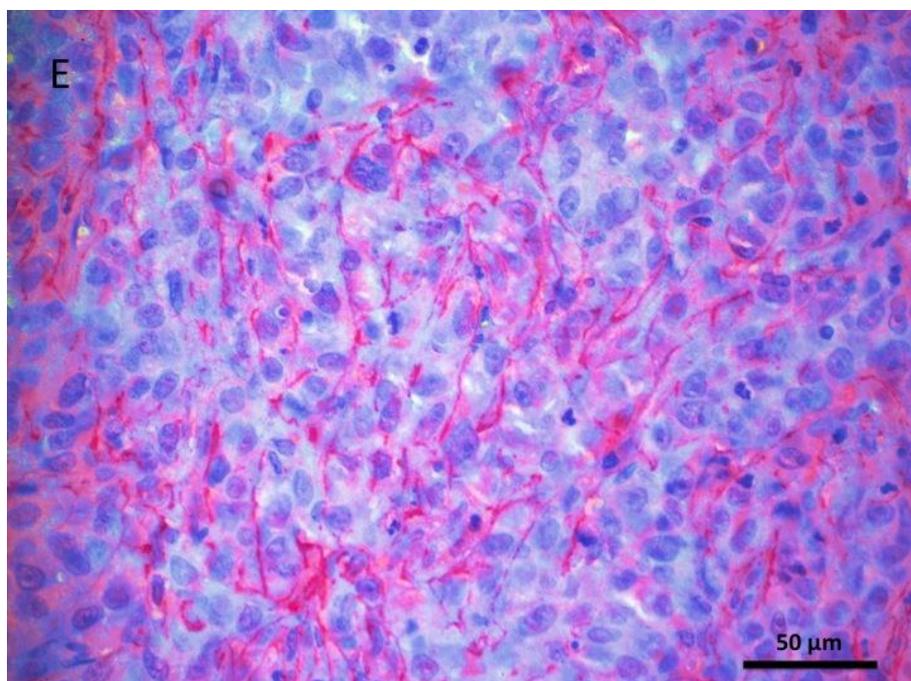
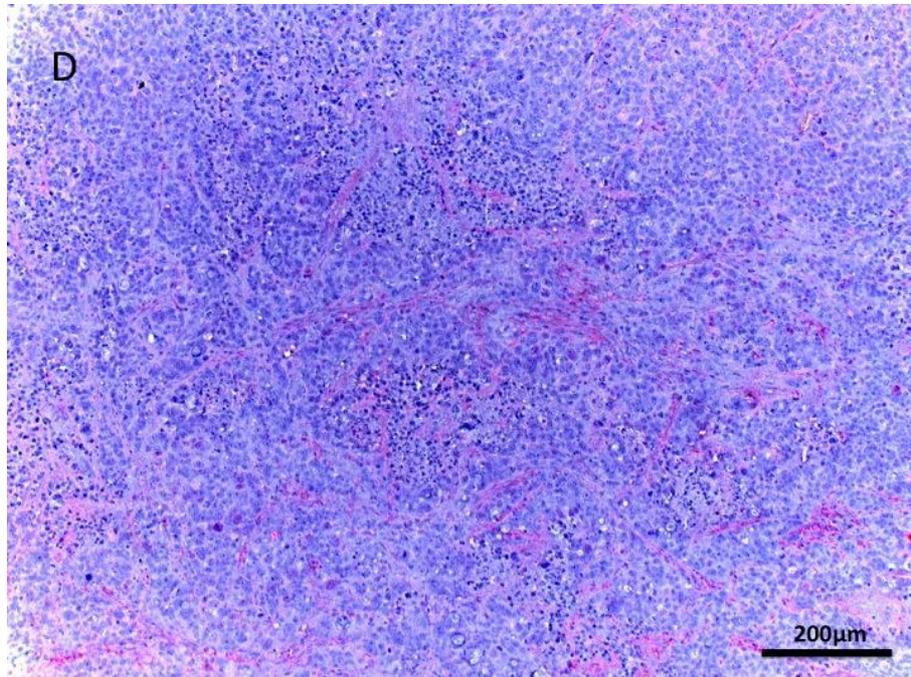
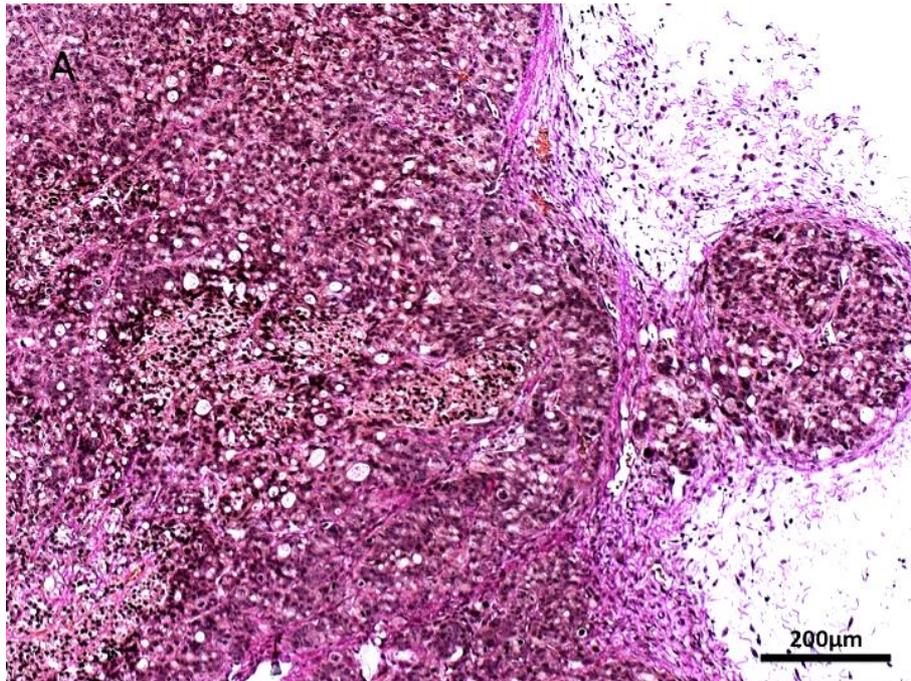


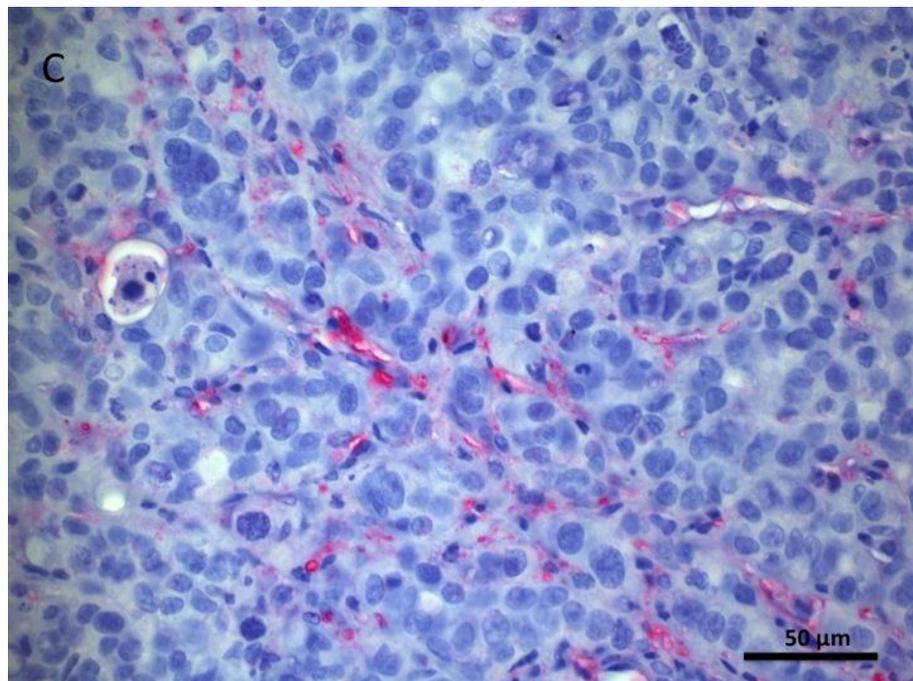
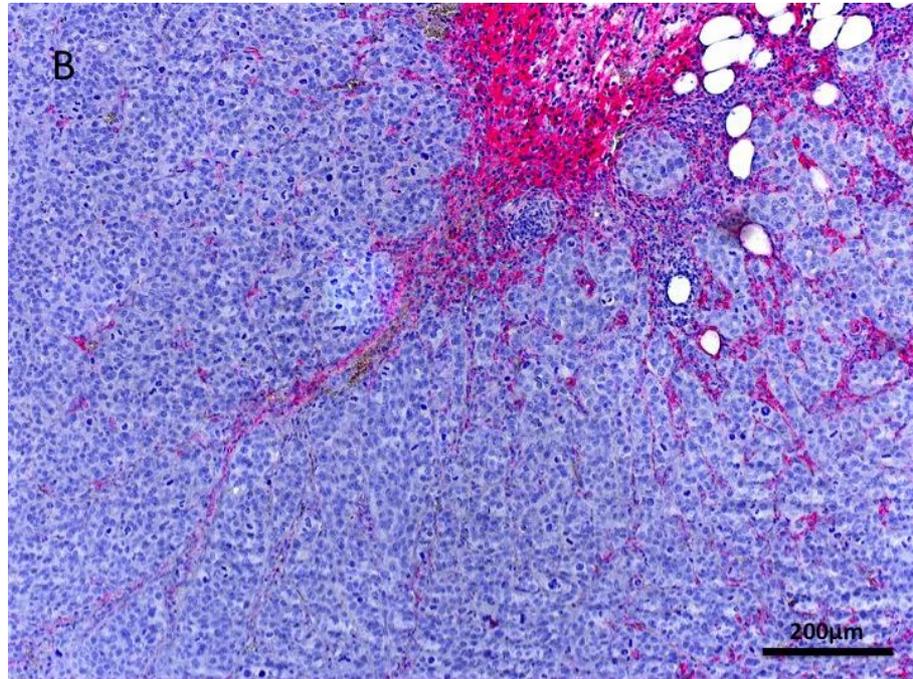
Abb 13: Primärtumor der humanen Prostatakarzinomzelllinie LNCAP in der Scid-Maus gewachsen.

A: van Gieson Färbung eines Prostatakarzinoms der Zelllinie LNCAP. Es zeigt sich eine ausgeprägte Septierung am Übergang zum murinen Gewebe. Wenige kleine azinäre Strukturen lassen auf eine geringdifferenzierte Form eines Prostatakarzinoms hin (Gleason-Score >7).

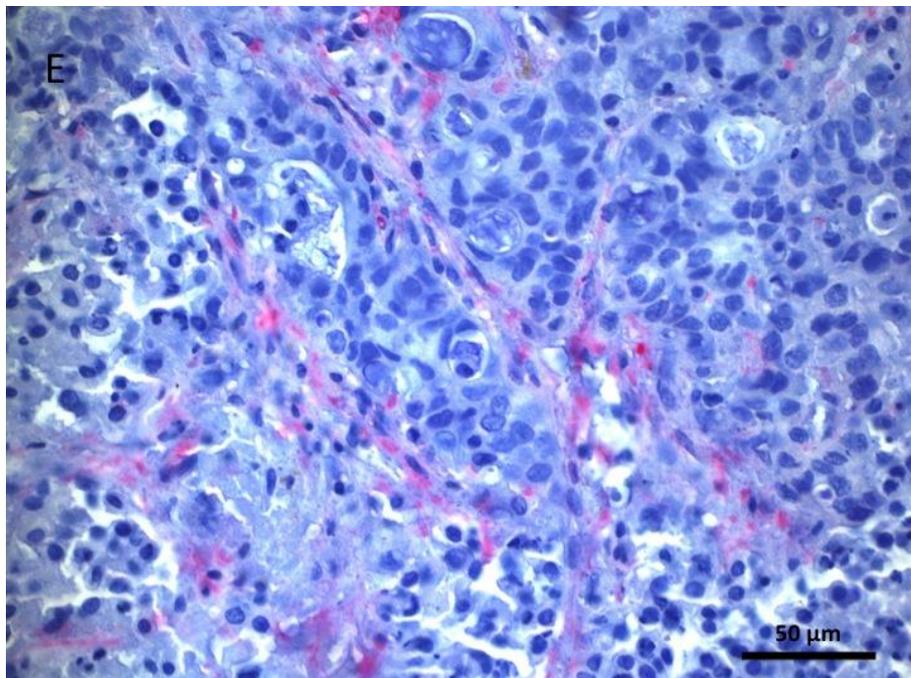
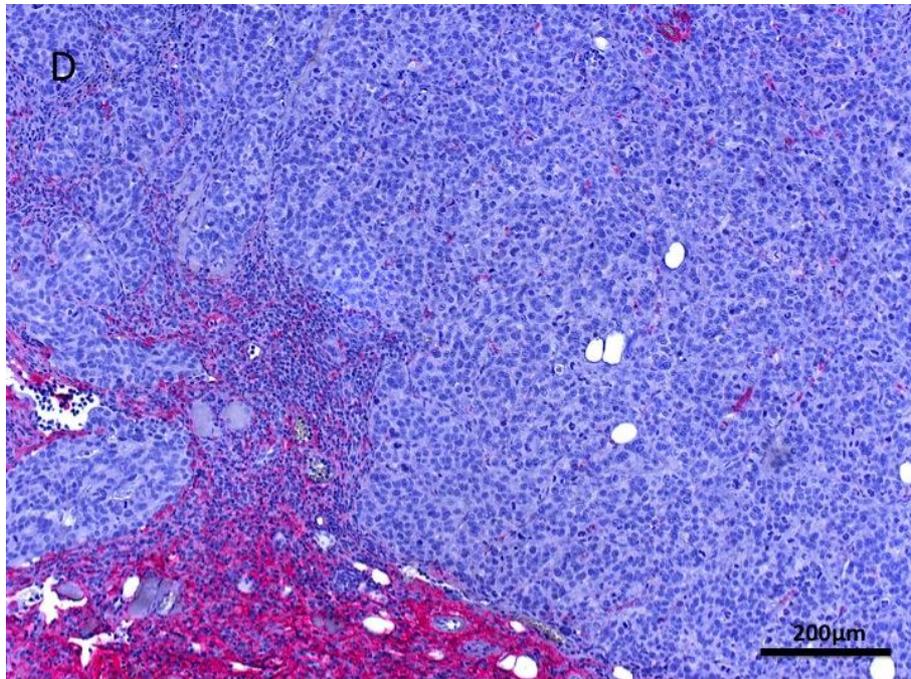


B: Darstellung von Hyaluronan in einem Prostatakarzinom LNCAP. Starke Reaktion im Randbereich zum murinen Gewebe mit Septierung und schwache Reaktion in den zellulären Anteil des Tumors.

C: Sehr geringe interzelluläre Intensität von Hyaluronan in einem Prostatakarzinom LNCAP. Das Präparat zeigt eine ausgeprägte Zell- und Kernpolymorphie.



D: Geringe Intensität von Kollagen Typ I in dem Prostatakarzinom LNCAP. Am Übergang zum murinen Gewebe ist Kollagen Typ I nachweisbar.
E: Vereinzelter Nachweis von schwacher Kollagen Typ I Deposition in den feinen Bindegewebssepten eines Prostatakarzinoms LNCAP.



4.4. Primärtumor der humanen Kolonkarzinomzelllinien HT29 und CaCo2

Die Intensität von dem in der extrazellulären Matrix deponierten Hyaluronan liegt in der Zelllinie HT29 bei 1,8. Die Zelllinie CaCo2 zeigt keine Deposition von Hyaluronan im vitalen Tumorgewebe. Lediglich die Rand- und Nekrosebereiche zeigen eine geringe Hyaluronandeposition. Die Verteilung von Hyaluronan im Tumor der Zelllinie HT29 beträgt 20%, die Nekrosezonen weisen auch bei diesem Tumor eine starke Hyaluronandeposition auf. Nekroseareale nehmen durchschnittlich 41% der Präparate ein. Die Kollagen Typ I Intensität und Verteilung liegt in der Zelllinie HT29 deutlich höher und verteilt sich homogener im Gesamtpräparat als in der Zelllinie CaCo2, die eine Kollagen Typ I Deposition hauptsächlich in den großen Bindegewebssepten zeigt.

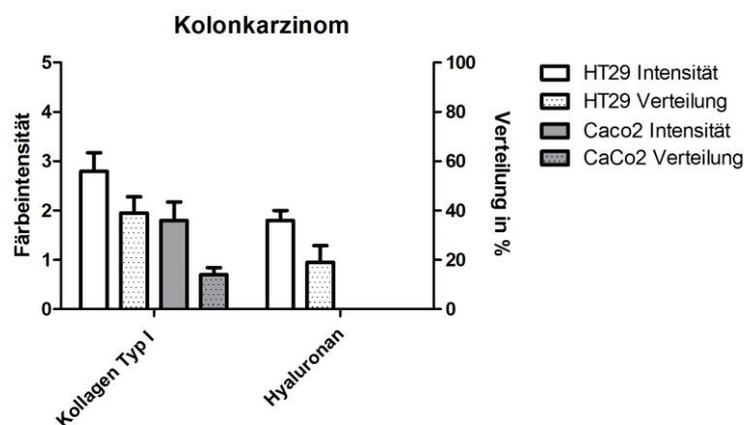
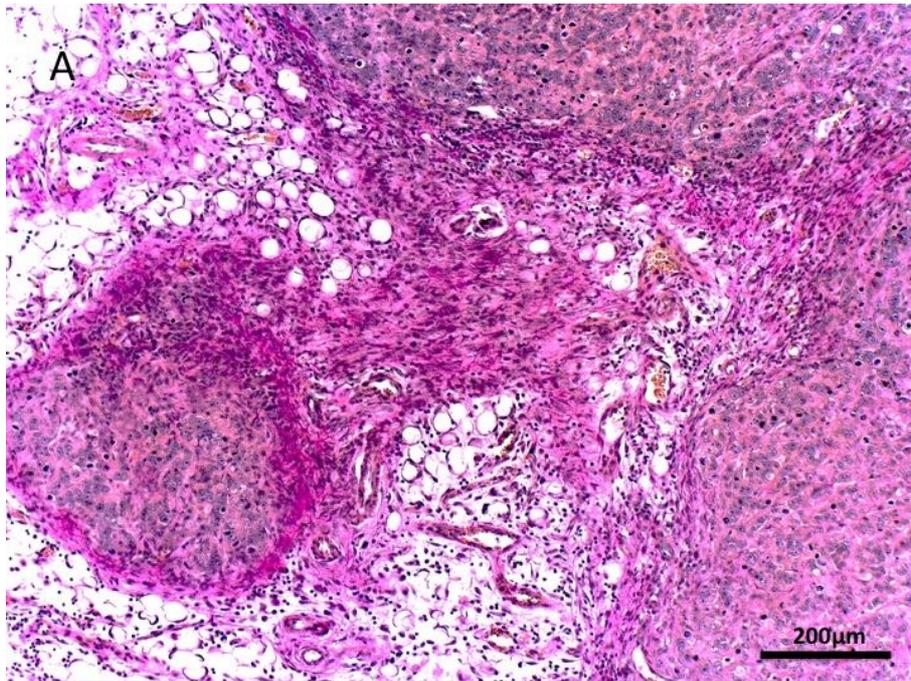


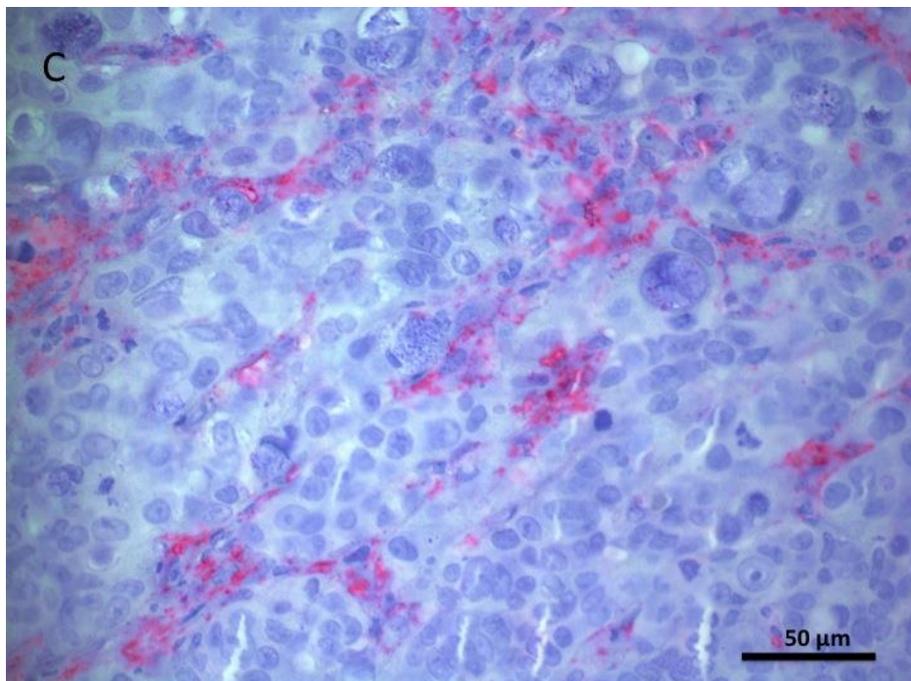
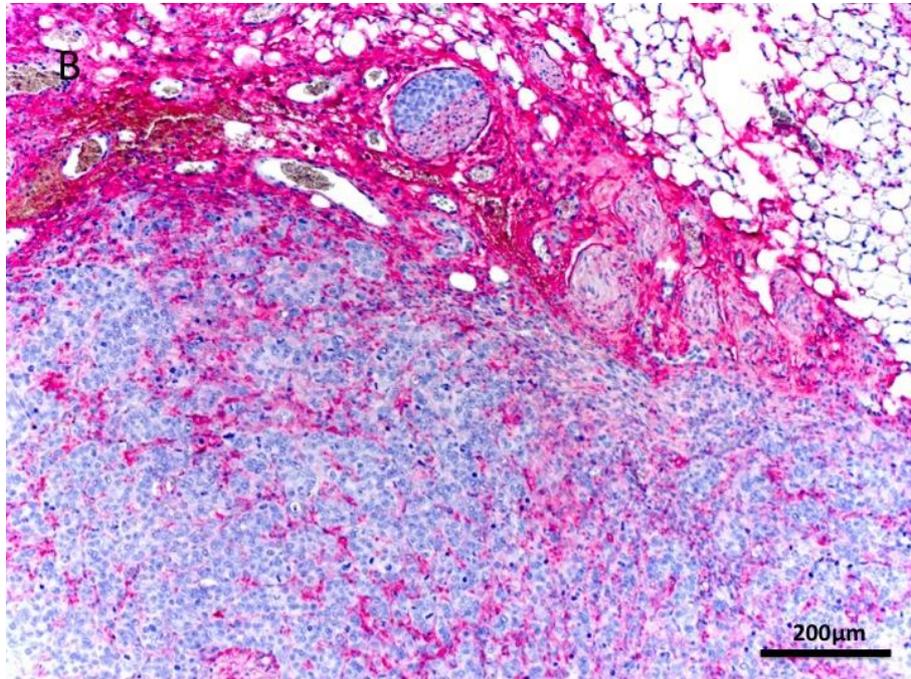
Abb 14: Färbeintensität und Verteilung von Kollagen Typ I und Hyaluronan in den Kolonkarzinomen der Zelllinien HT29 und CaCo2. In der Zelllinie CaCo2 gibt es nur in den Randbereichen zum murinen Gewebe einen Nachweis von Hyaluronan.

Abb 15: Primärtumor der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 in der Scid-Maus gewachsen.

A: van Gieson Färbung eines Kolonkarzinoms HT29. Starke Bindegewebsstränge und hoher Bindegewebsanteil im Randbereich des Tumors zum Bindegewebe der Maus. Drüsenstrukturen fehlen, was auf ein undifferenziertes Adenokarzinom hinweist.



B: Ausgeprägte Hyaluronandeposition in den Bindegewebssepten des humanen xenograft Kolonkarzinoms HT29 aus einer Scid-Maus.
C: Hyaluronan dargestellt in den interzellulären Septen eines Kolonkarzinoms der Zelllinie HT29.



D: Ausgeprägte Deposition von Kollagen Typ I in den Bindegewebssepten des humanen Kolonkarzinoms HT29 mit geringer Reaktion in den zellulären Bereichen.

E: Darstellung von Kollagen Typ I in den interzellulären Septen eines Kolonkarzinoms HT29.

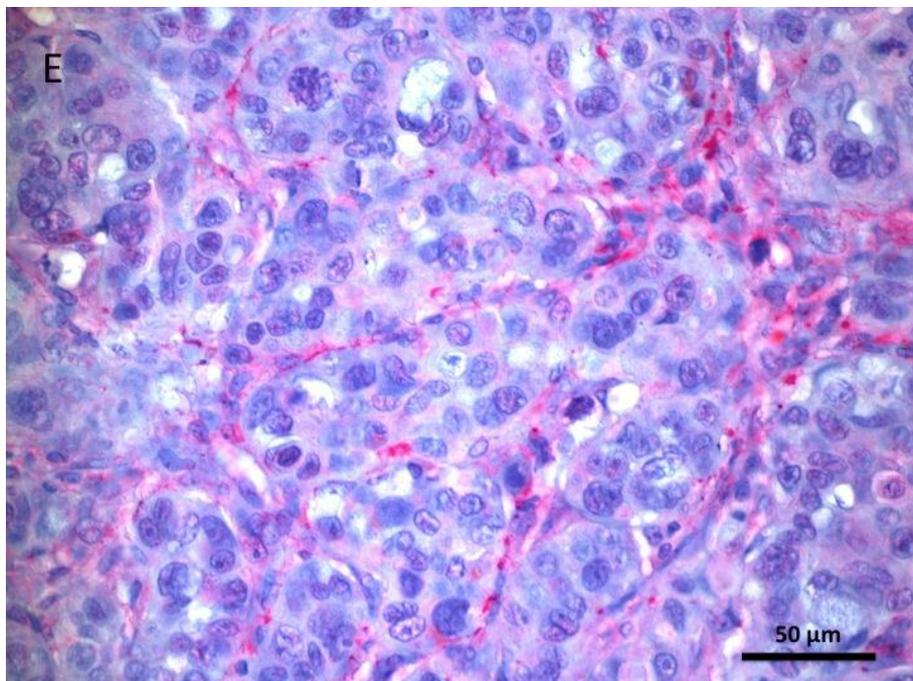
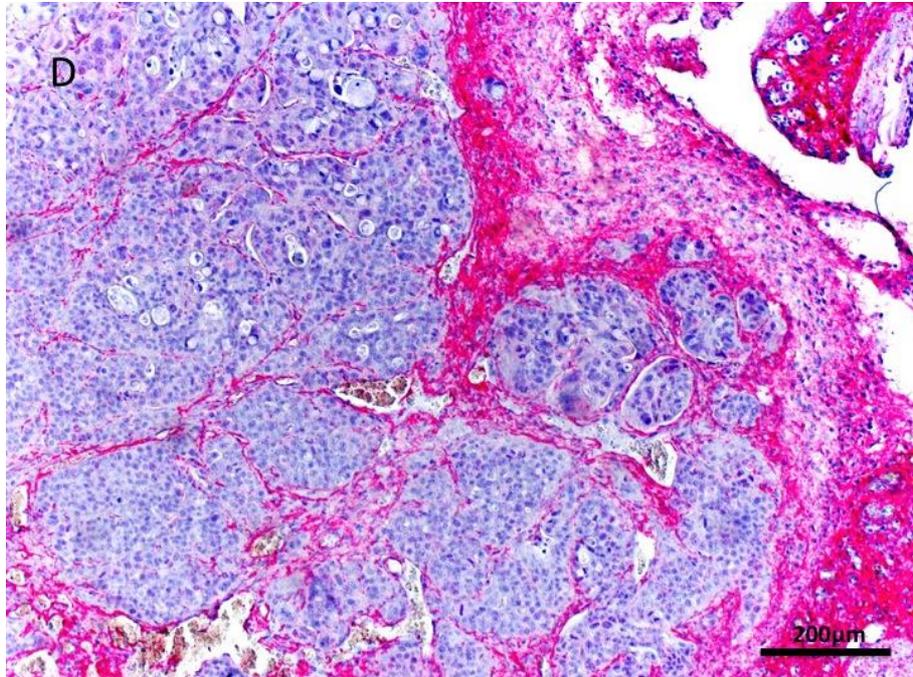


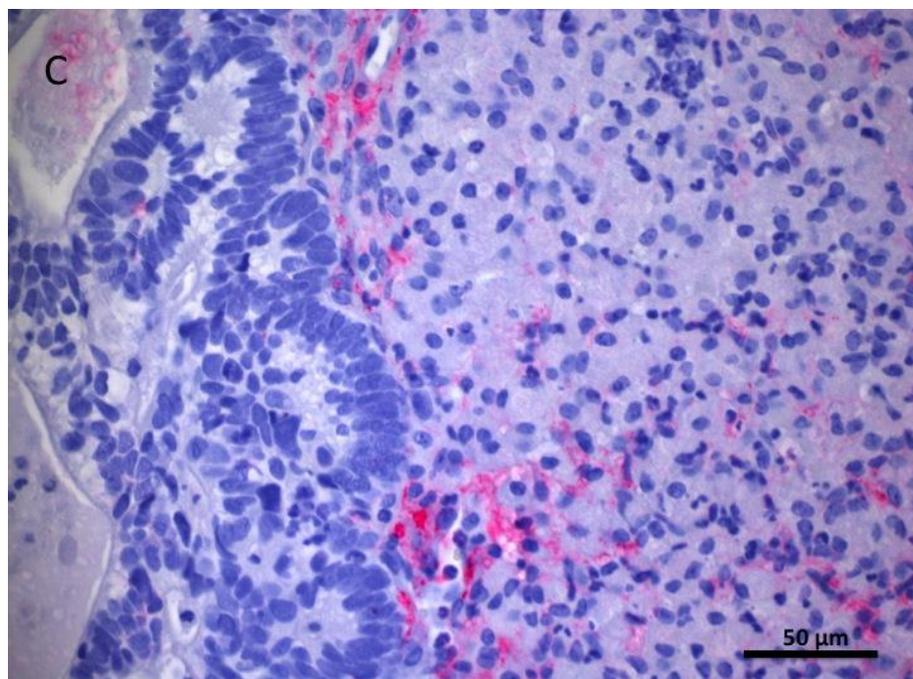
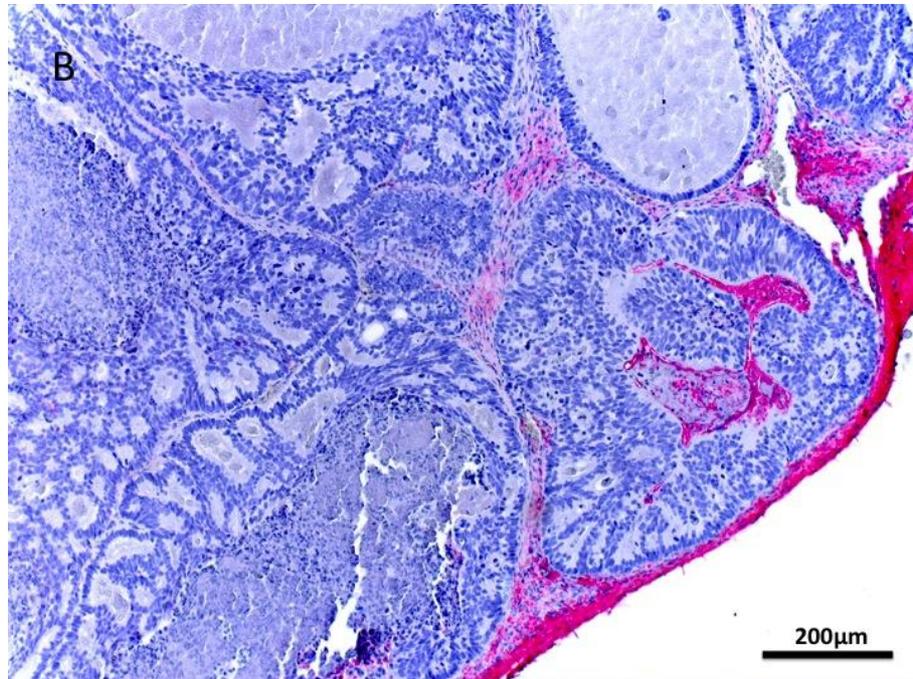
Abb 16: Primärtumor der humanen Kolonkarzinomzelllinie CaCo2 in der Scid-Maus gewachsen.

A: Kolonkarzinom CaCo2 in einer van Gieson Färbung. Ausgeprägte Septierung und Anreicherung von Detritus (orange) in den Tumorzysten. Dieser Tumor zeichnet sich durch eine hohe Organisation aus, mit z.T. kryptenähnlichen Strukturen. Daher kann man von einem hochdifferenzierten Adenokarzinom ausgehen.



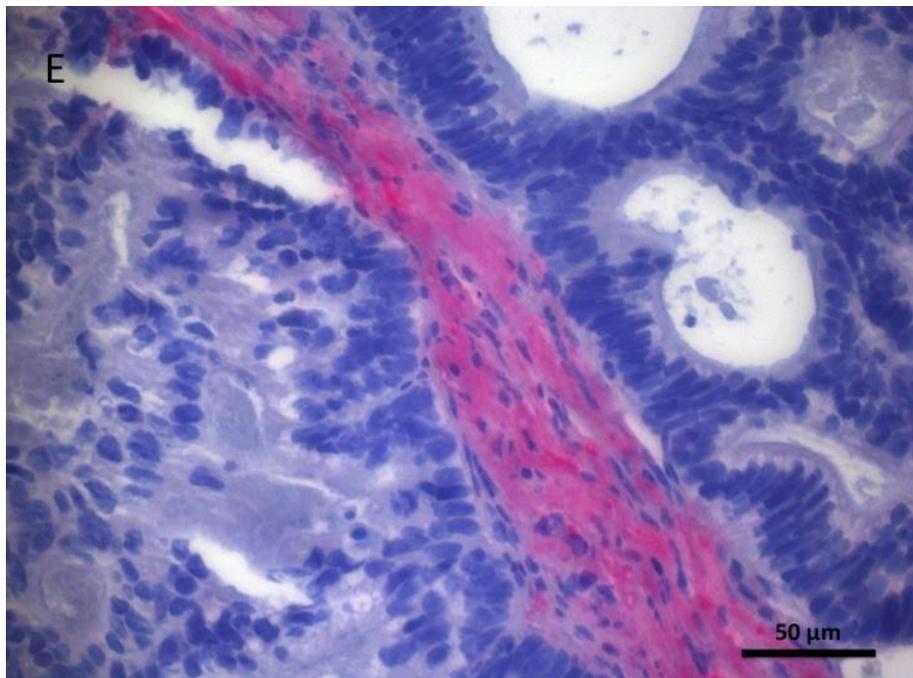
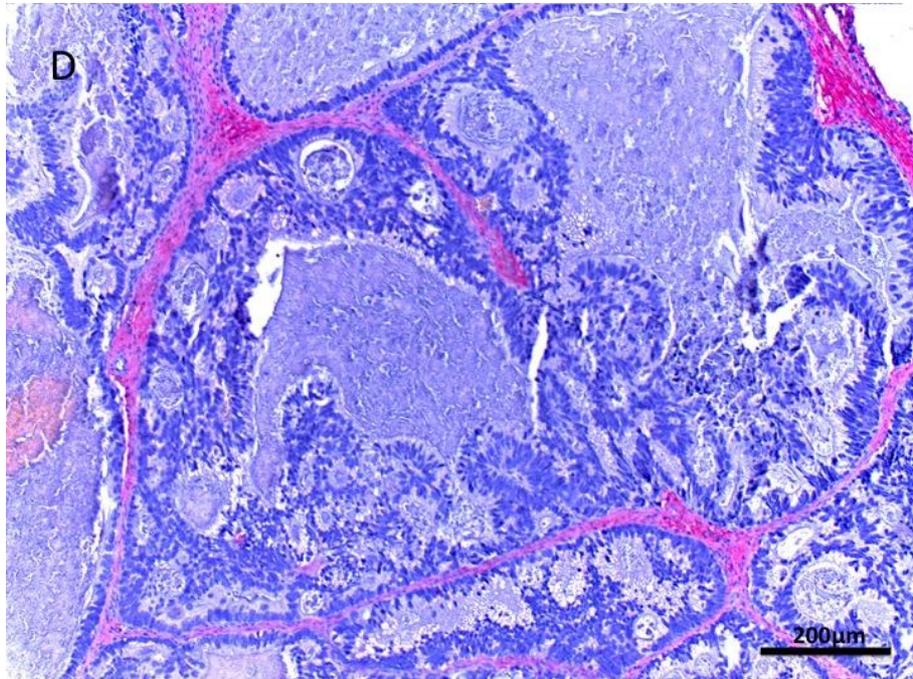
B: Darstellung von Hyaluronan in einem Kolonkarzinom CaCo2. Nur die Septen, die vom Übergang zum murinen Gewebe ausgehen zeigen einen Nachweis von Hyaluronan.

C: Geringe Hyaluronanintensität in einem Kolonkarziom CaCo2. Die zellulären drüsenförmigen Tumoranteile beinhalten kein Hyaluronan.



D:Die Septen des Kolonkarzinoms CaCo2 zeigen Anteile von Kollagen Typ I.

E:Nachweis von Kollagen Typ I in einer Bindegewebssepte eines Kolonkarzinoms CaCo2. Das Präparat zeigt Karzinomdrüsen in Angrenzung an die Septen.



4.5. Primärtumore der humanen kleinzelligen Bronchiolkarzinomzelllinien OH1 und OH3

Die Zelllinie OH1 zeigt eine deutlich stärkere Intensität der Hyaluronan-Deposition als die Zelllinie OH3. Lediglich die Randbereiche zum murinen Gewebe zeigen eine ausgeprägtere Deponierung von Hyaluronan. Die Verteilung von Hyaluronan liegt durchschnittlich bei 7%, wobei der Tumor der Zelllinie OH1 deutlich mehr positive Areale aufweist als der Tumor der Zelllinie OH3. Nekroseareale nehmen durchschnittlich 35% der Präparate ein. Die Intensität und Verteilung von Kollagen Typ I in den vitalen Tumorarealen ist bei der Zelllinie OH1 deutlich ausgeprägter als in dem Bronchiolkarzinom der Zelllinie OH3.

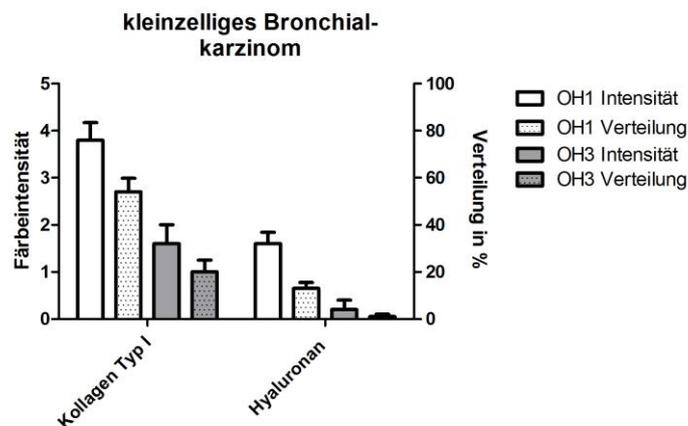
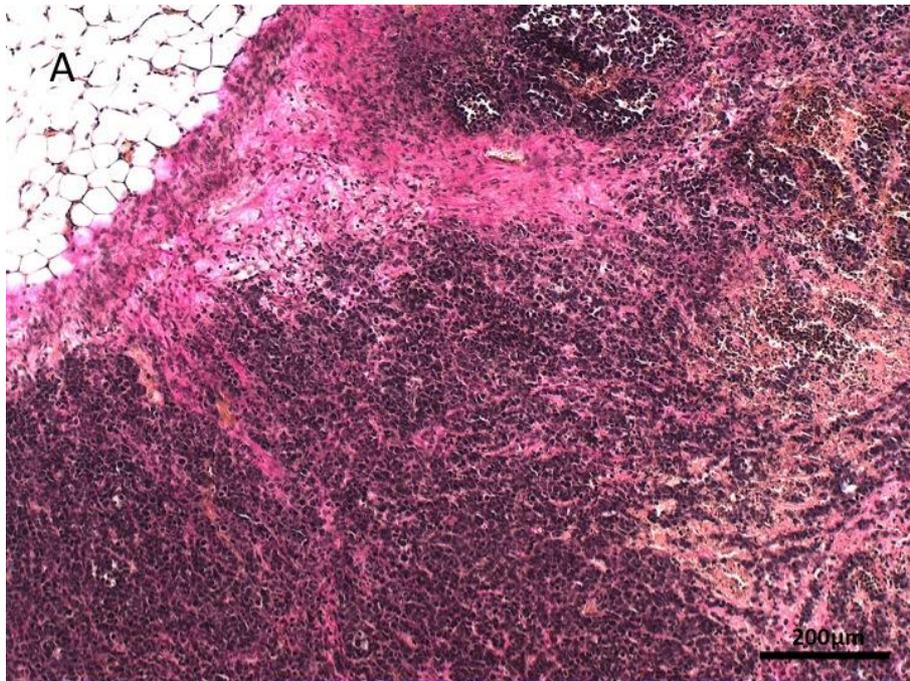


Abb 17: Intensitäten und Verteilung von Kollagen Typ I und Hyaluronan in den Bronchiolkarzinomen der Zelllinien OH1 und OH3. Das Bronchiolkarzinom der Zelllinie OH1 weist mehr Kollagen Typ I und Hyaluronan auf.

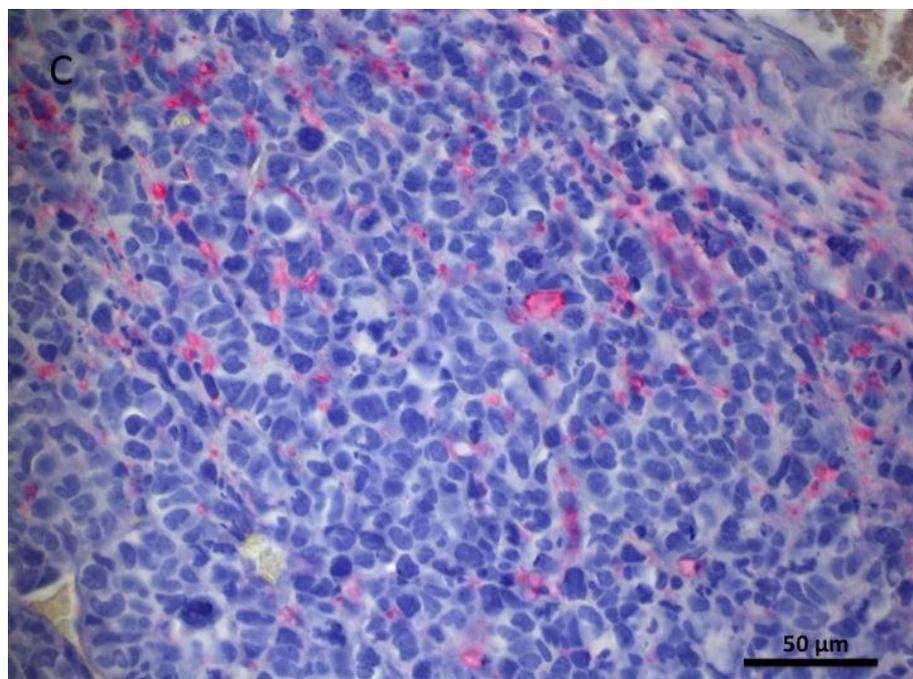
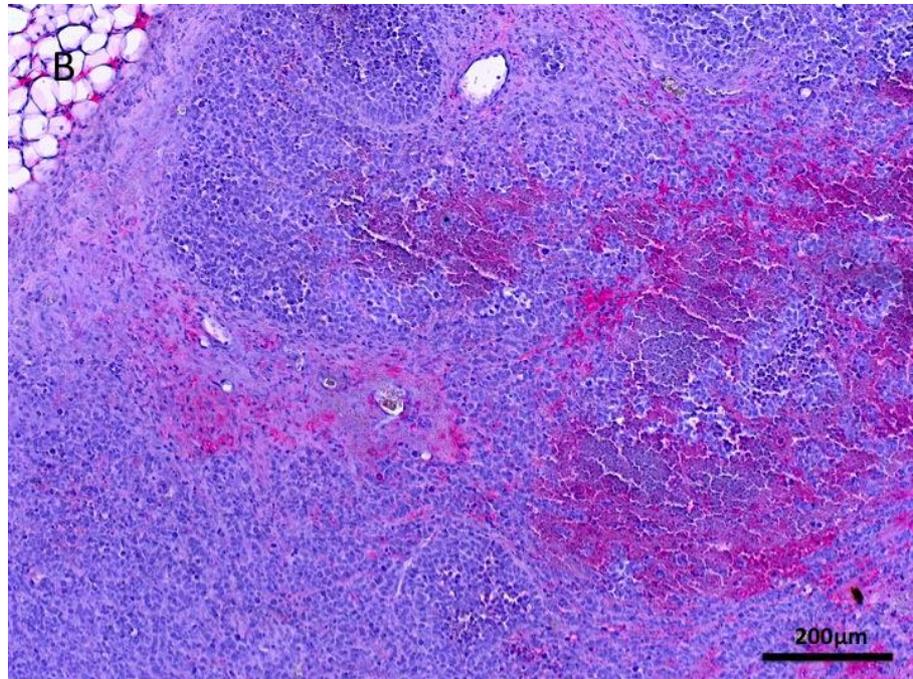
Abb 18: Primärtumor der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie OH1 in der Scid-Maus gewachsen.

A: Kleinzelliges Bronchialkarzinom OH1 in der Van Gieson Färbung. Starke bindegewebige Durchsetzung des Tumorgewebes mit ausgeprägten Nekrosearealen.



B: Kleinzelliges Bronchialkarzinom OH1 mit deutlichem Nachweis von Hyaluronan in den Nekrosebereichen und den Bindegewebssepten. In den zellulären Anteilen findet sich eine schwache Deposition von Hyaluronan.

C: Primärtumor des kleinzelligen Bronchialkarzinoms OH1 zeigt schwache Ablagerung von interzellulärem Hyaluronan.



D:Das Bronchialkarzinom OH1 zeigt eine ausgeprägte Färbereaktion von Kollagen Typ I mit teilweise feinen Septierung des Tumorgewebes.
E:Deutlicher Nachweis von Kollagen Typ I in den interzellulären Räumen bei einem Primärtumor des kleinzelligen Bronchialkarzinoms OH1.

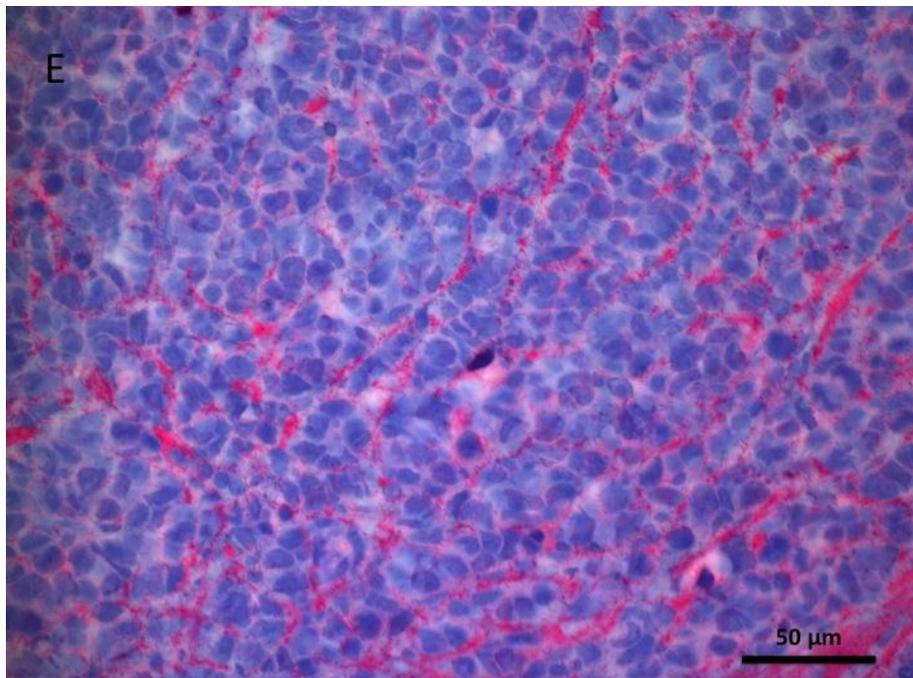
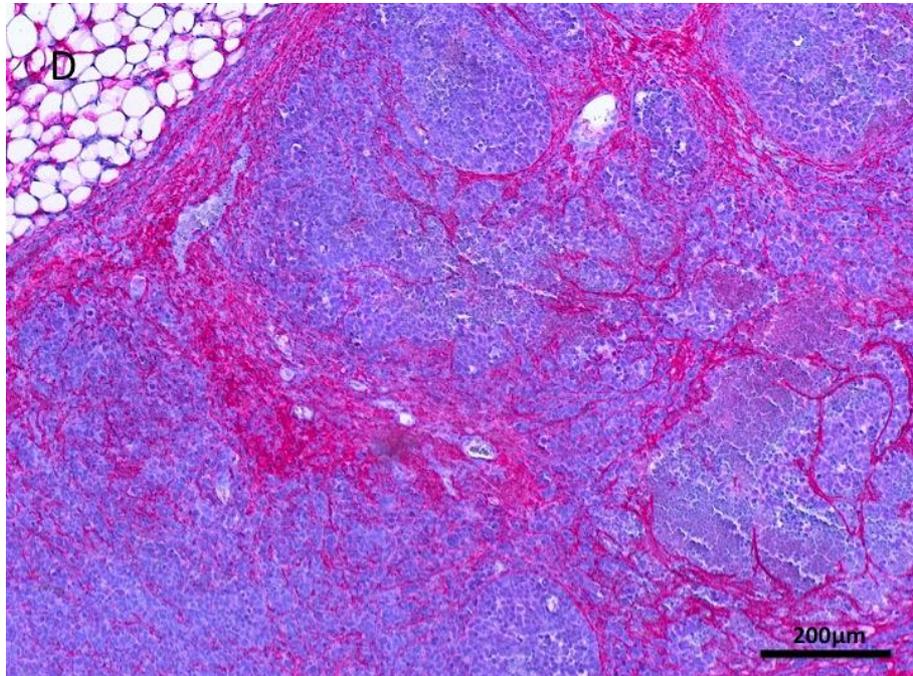
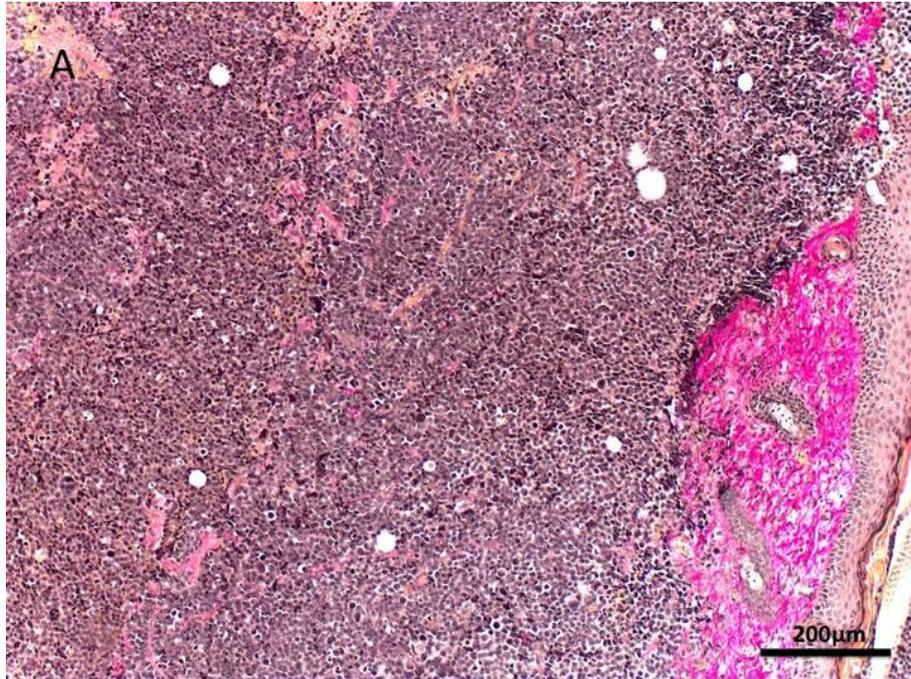


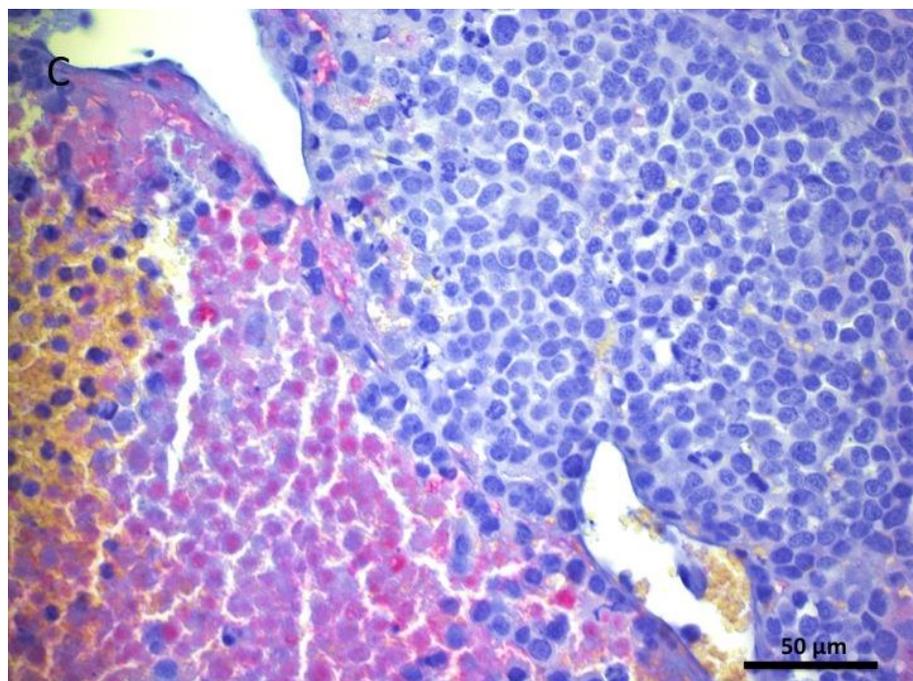
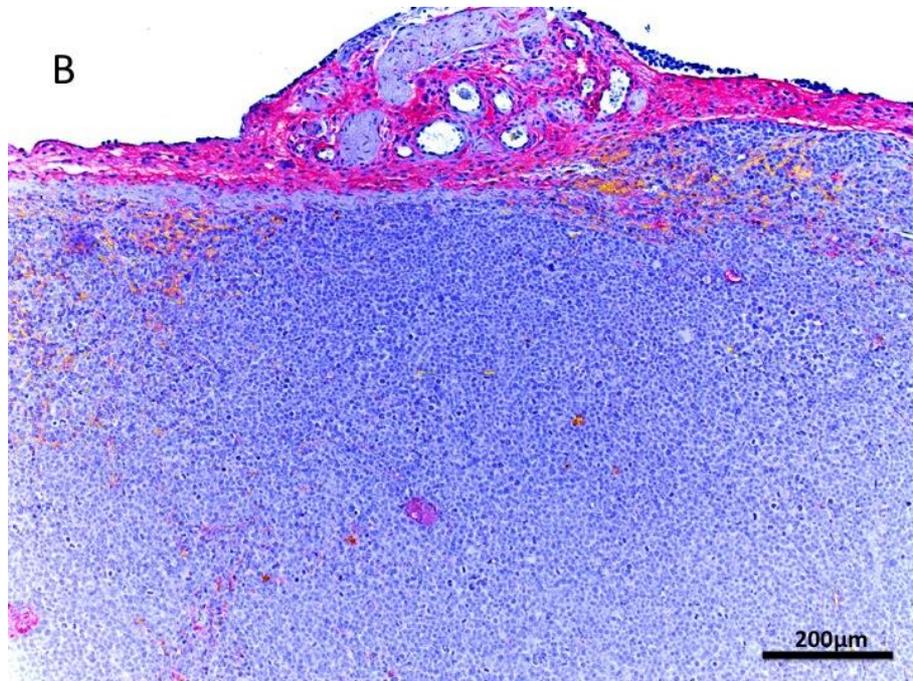
Abb 19: Primärtumor der humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie OH3 in der Scid-Maus gewachsen.

A: Kleinzelliges Bronchialkarzinom OH3 in der van Gieson Färbung. Die Darstellung des Bindegewebes im rechten Bildbereich liegt am Übergang zum murinen Gewebe. Sonst liegt nur eine geringe Septierung des Tumorgewebes vor.



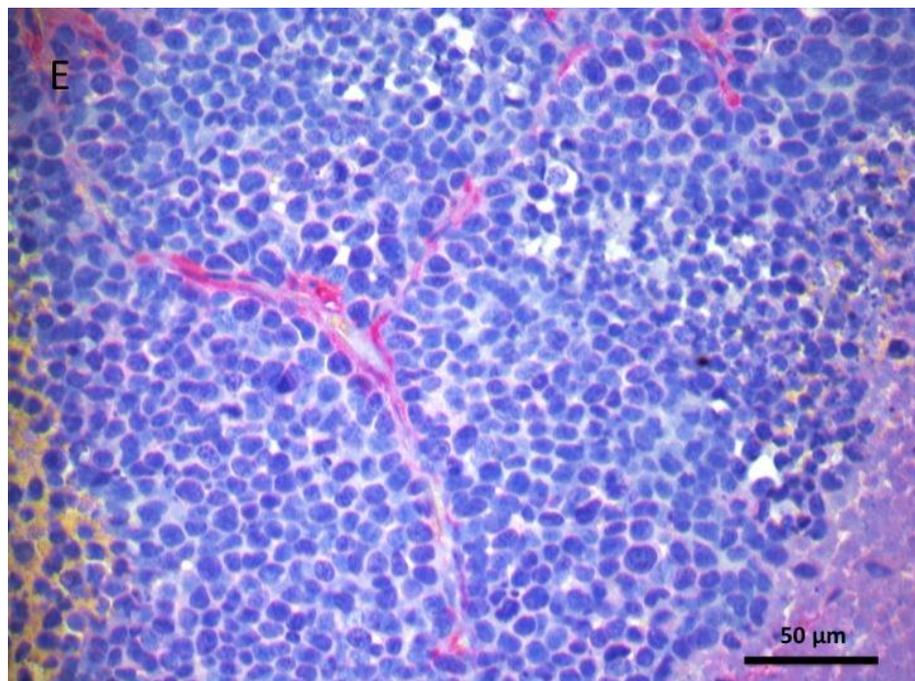
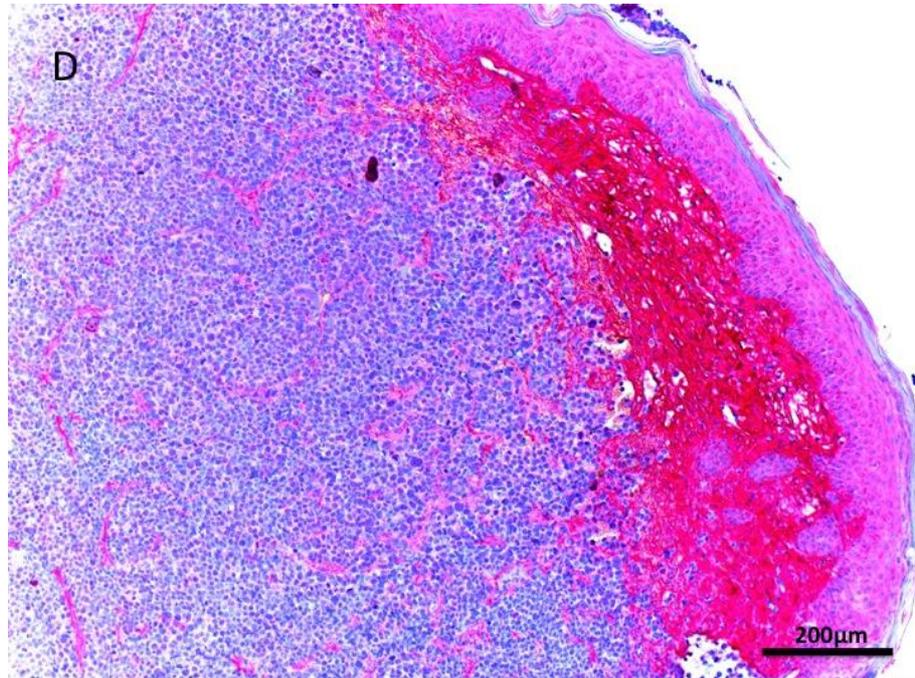
B:kleinzelliges Bronchialkarzinom OH3 mit einer schwachen Intensität von Hyaluronan. Lediglich der murine Randbereich zeigt eine deutliche Färbereaktion.

C:In einem kleinzelligen Bronchialkarzinom OH3 zeigt sich am Übergang zur Nekrose ein Bereich, in dem Hyaluronan nachweisbar ist.



D:Das kleinzellige Bronchialkarzinom OH3 weist eine deutliche Reaktion von Kollagen Typ I auf. Der Randbereich weist einen hohen Anteil von Kollagen Typ I auf, und setzt sich mit feinen Septen in das Tumorgewebe fort.

E:Feine Septen mit Nachweis von Kollagen Typ I bei einem kleinzelligen Bronchialkarzinom OH3.



4.6. Primärtumore der humanen malignen Melanomzelllinien Mewo und FemX-1

Die Intensitäten der Hyaluronan deposition sind in den Zelllinien FemX-1 und Mewo annähernd ausgeglichen. Die Verteilung von Hyaluronan liegt durchschnittlich bei 10%, wobei auch hier die Zelllinien FemX-1 und Mewo geringfügig voneinander abweichen. Die Zelllinie Mewo zeigt eine deutlich stärkere Reaktion auf Kollagen Typ I als das Melanom der Zelllinie FemX-1. Nekroseareale nehmen durchschnittlich 52% der Präparate ein. Bei der Verteilung von Kollagen Typ I weichen die Zelllinien deutlich voneinander ab. Die Zelllinie FemX-1 weist deutlich geringere Verteilung auf als das Melanom der Zelllinie Mewo.

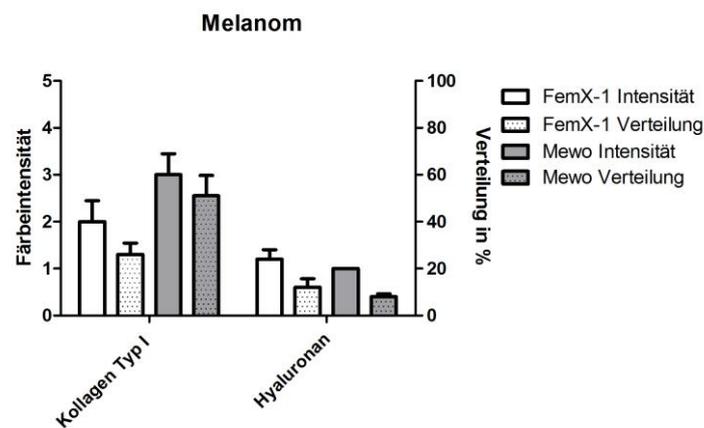
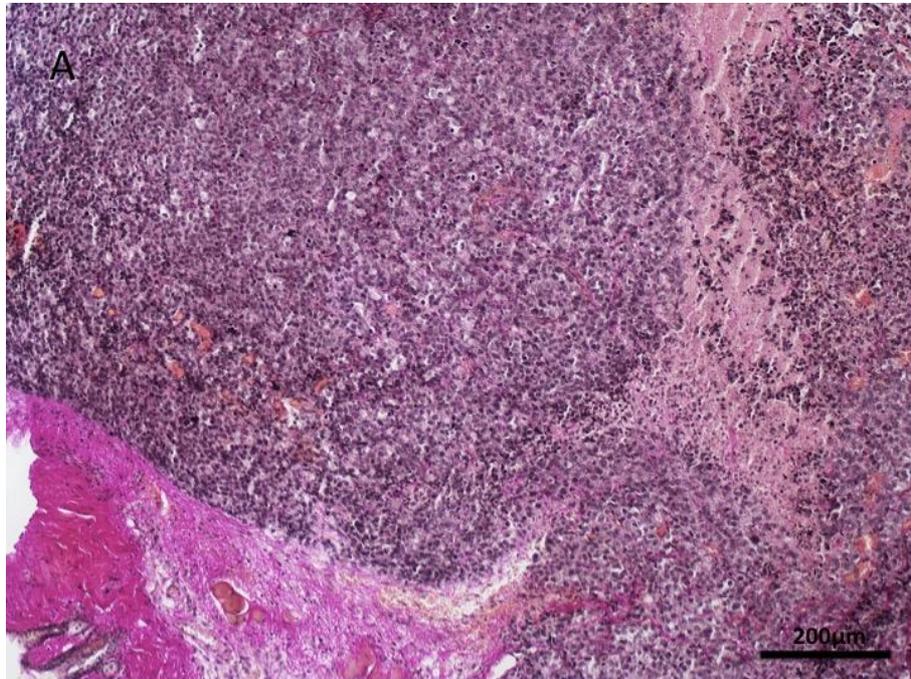


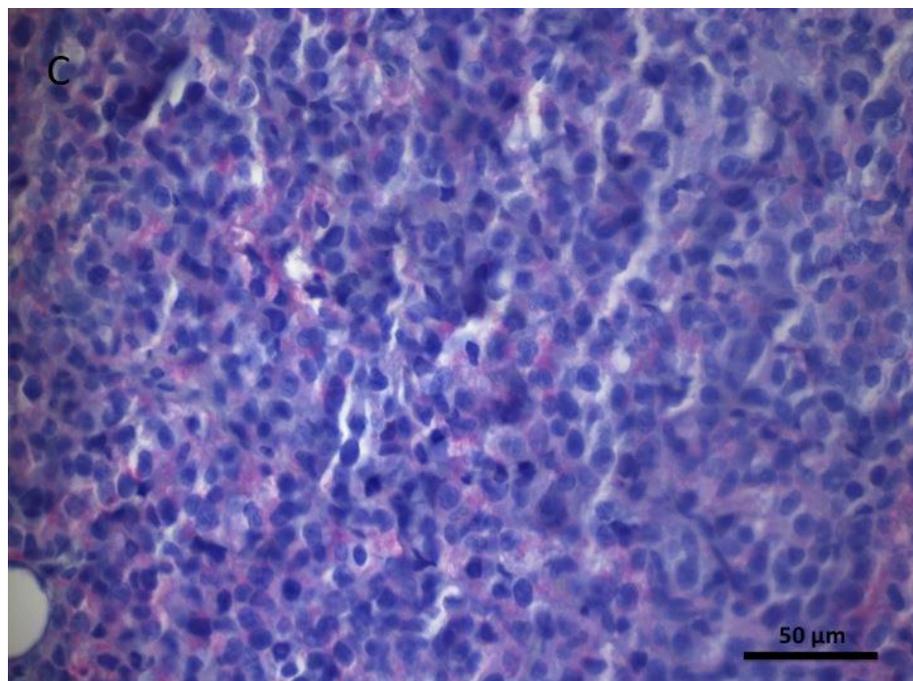
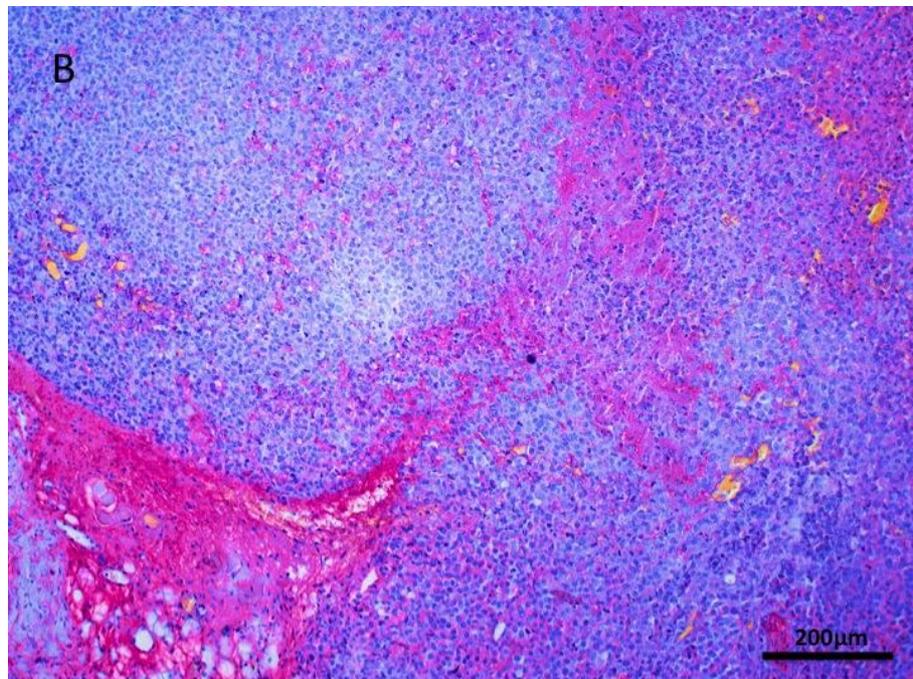
Abb 20: Färbeintensität und Verteilung von Kollagen Typ I und Hyaluronan in der Melanomen der Zelllinien FemX-1 und Mewo. Auffällig ist die sehr starke Färbeintensität und Verteilung von Kollagen Typ I in dem Melanom der Zelllinie Mewo.

Abb 21: Primärtumor der humanen Melanomzelllinie FemX-1 in der Scid-Maus gewachsen.

A: Melanom FemX-1 in der van Gieson Färbung, Bindegewebe wächst von den murinen Randbereichen in das Tumorgewebe ein. Das gesamte Tumorgewebe ist nur gering durch Bindegewebe septiert.



B: Malignes Melanom FemX-1 zeigt Hyaluronan im Bereich der Nekrose und in der Randzone.
C: Hyaluronan ist im malignen Melanom FemX-1 kaum abgelagert.



D: Malignes Melanom FemX-1 zeigt eine geringe Intensität von Kollagen Typ I. Lediglich in den Randbereichen ist ein deutlicher Nachweis möglich.
E: Geringer Expression von Kollagen Typ I in feinen bindegewebigen Septen des malignen Melanoms FemX-1.

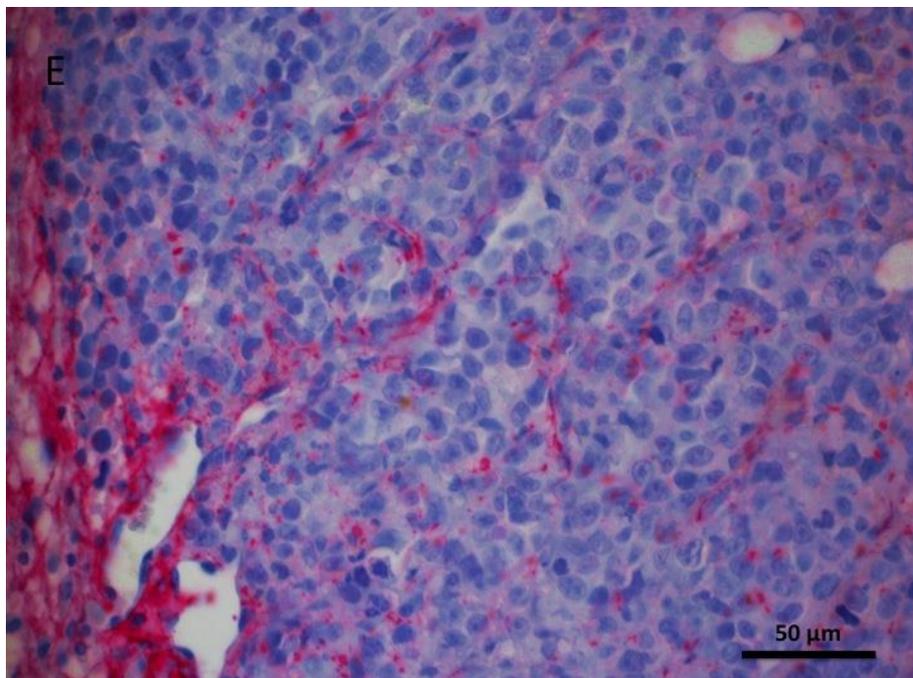
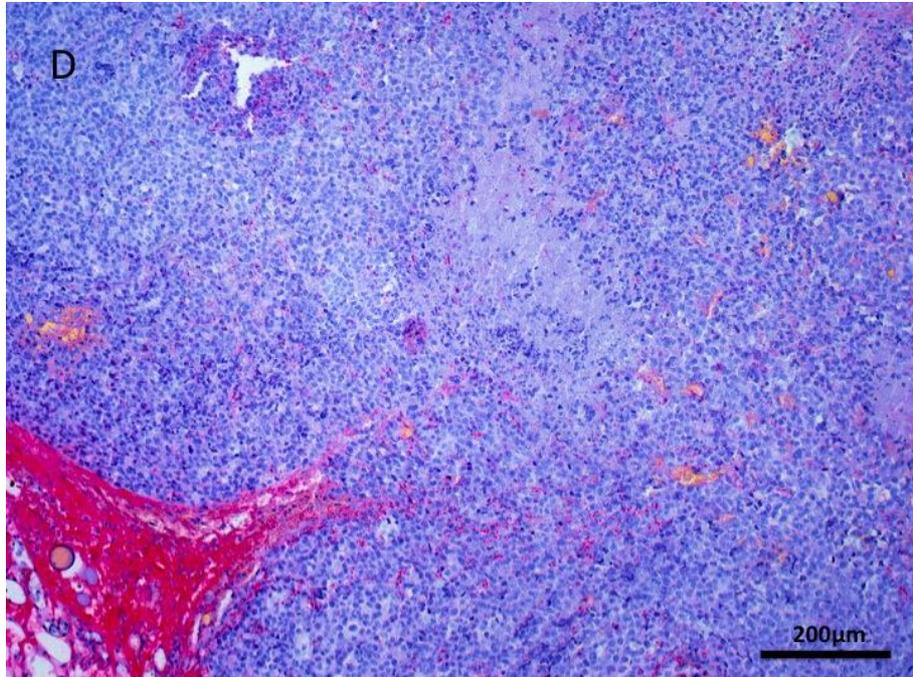
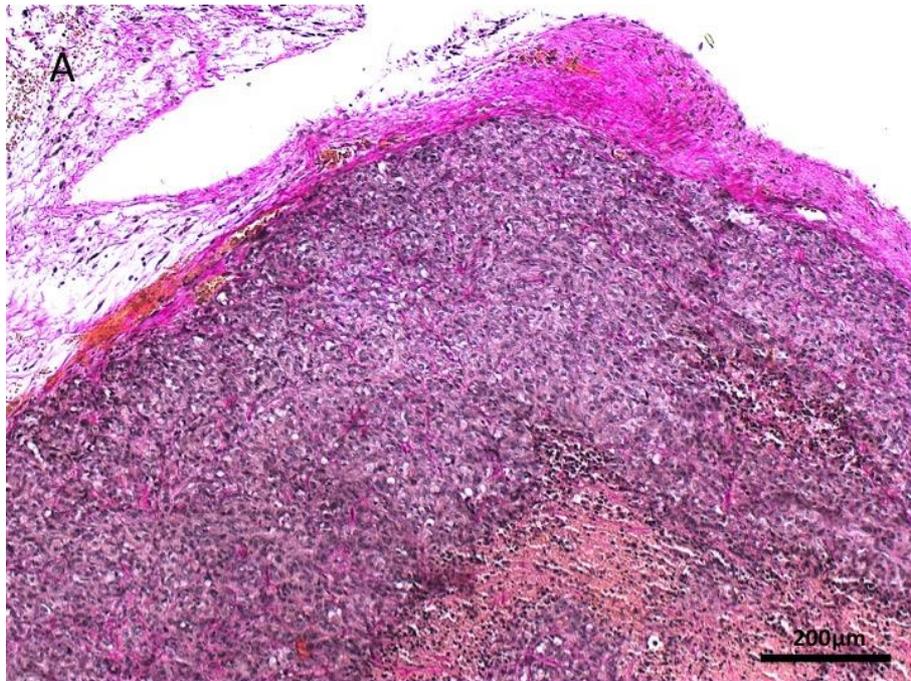


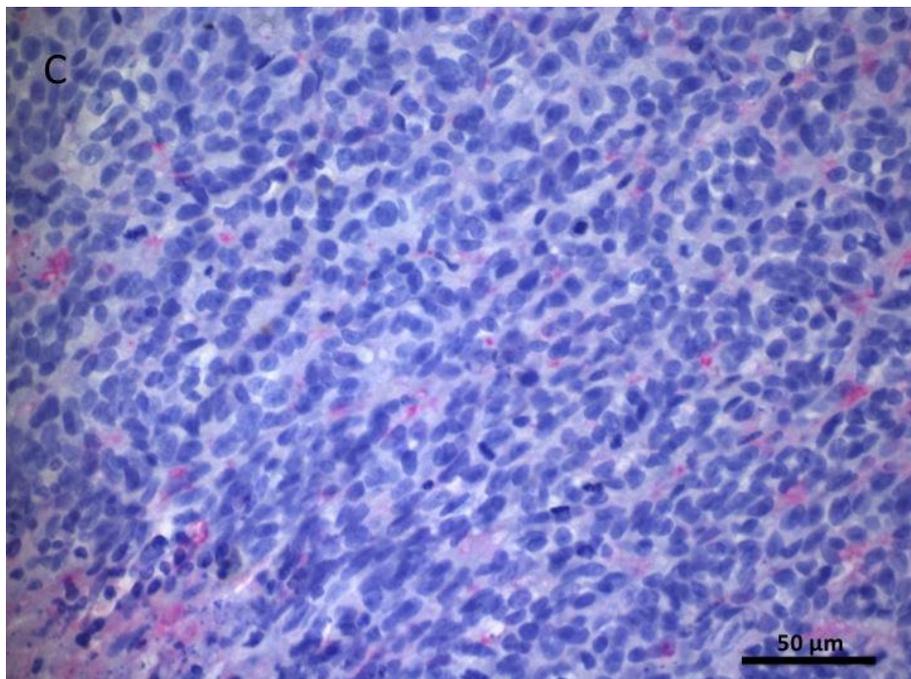
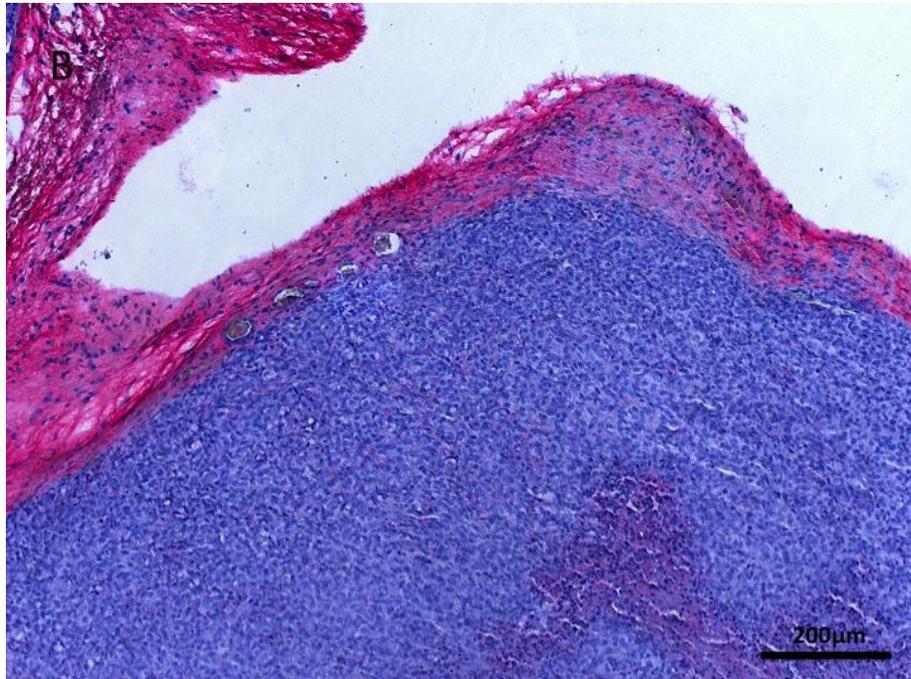
Abb 22: Primärtumor der humanen Melanomzelllinie Mewo in der Scid-Maus gewachsen.

A: Van Gieson Färbung bei einem Melanom Mewo.
Bindegewebe findet sich hauptsächlich in den Randbereichen.
Anschnitte von Nekrosearealen im Bild rechts unten.



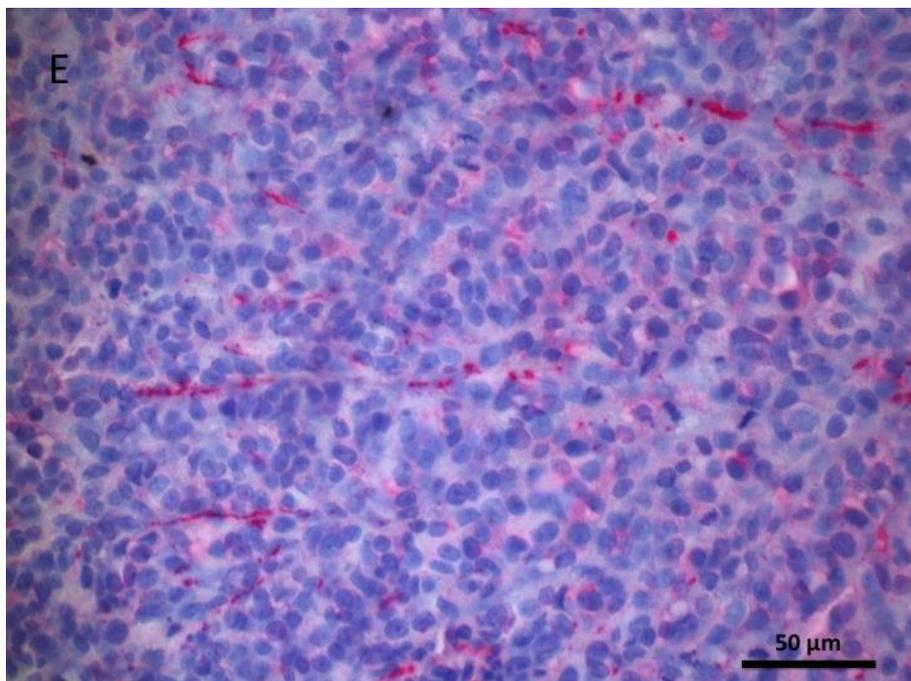
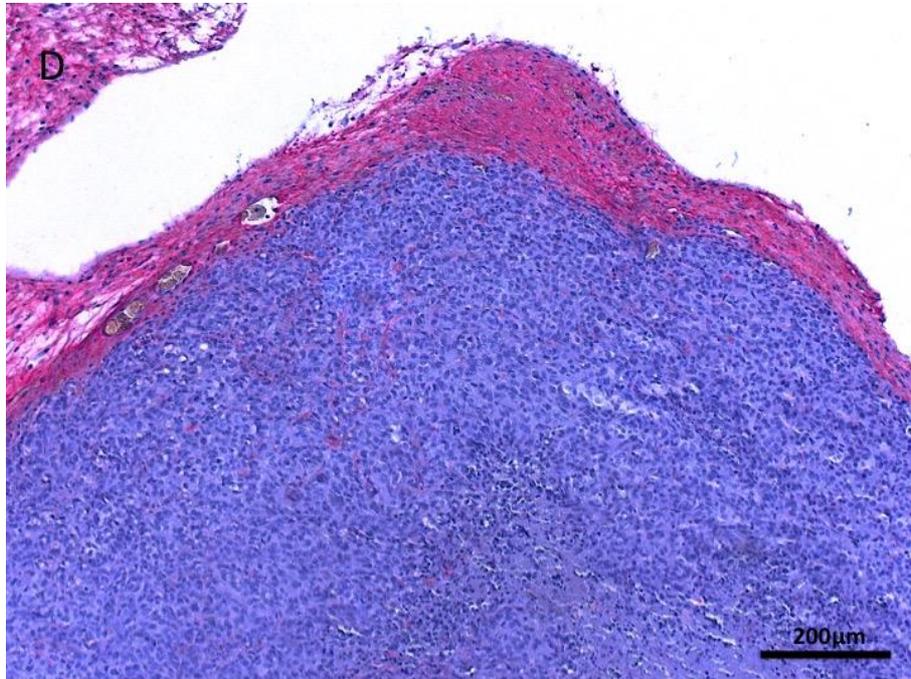
B: Nachweis von Hyaluronan im Randbereich und Nekroseareal eines malignen Melanoms Mewo. Vitale Bereiche zeigen eine reduzierte Reaktion.

C: Geringer Nachweis von Hyaluronan in der vitalen Tumorregion bei einem malignen Melanom Mewo.



D: Nur die Randbereiche zeigen eine deutliche Intensität von Kollagen Typ I. Das zelluläre Tumorgewebe hat nur sehr geringe Anteile von Kollagen Typ I.

E: Geringe Mengen von Kollagen Typ I in feinen Septen eines malignen Melanoms der Zelllinie Mewo.



4.7.1. Vergleich der Entitäten

Die untersuchten Primärtumore der humanen Mammakarzinomzelllinien T47D und MCF7 aus Scid Mäusen zeigen sowohl bei der Intensität (durchschnittlich 2,2) als auch bei der Verteilung (durchschnittlich 20%) von Hyaluronan die stärkste Reaktion aller untersuchten Tumorentitäten auf (siehe Abb.24). Die Primärtumore der humanen Pankreaskarzinomzelllinien 5061 und 5072 weisen eine geringfügig schwächere Reaktion auf. Auch die Intensität und Verteilung von Kollagen Typ I ist bei den Primärtumoren der Mammakarzinomzelllinien und Pankreaskarzinomzelllinien am stärksten ausgeprägt, wobei die Tumoren der Prostatazelllinien die geringste Deposition zeigen. Bei der Verteilung von Kollagen Typ I fallen besonders die Entitäten Prostatakarzinom und Kolonkarzinom auf, die eine geringere Deponierung von Kollagen Typ I in der Matrix zeigen. Wie in Abb. 24 dargestellt wird, weisen die weiteren untersuchten Entitäten eine vergleichbare Intensität und Verteilung von Hyaluronan und Kollagen Typ I in der extrazellulären Matrix auf.

Hyaluronan

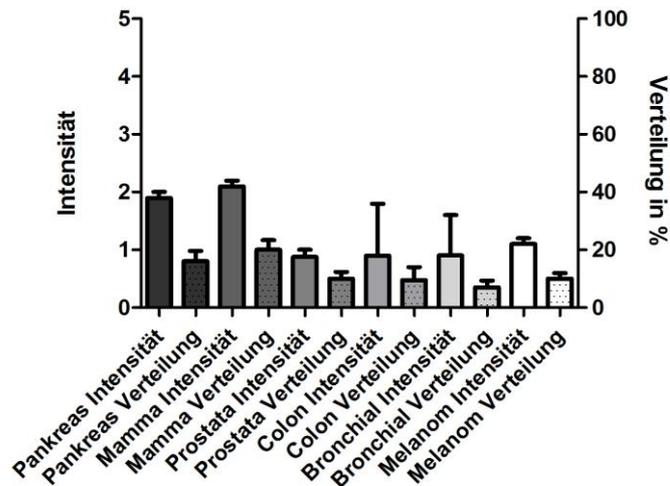


Abb 24: Färbeintensitäten und Verteilung von Hyaluronan. Die Pankreaskarzinome der Zelllinien 5072 und 5061 sowie die Mammakarzinome der Zelllinien T47D und MCF7 weisen die stärksten Färbeintensitäten von Hyaluronan auf. Die Prostatakarzinome der Zelllinien PC3 und LNCAP weisen auch beim Hyaluronan die geringsten Werte auf.

Kollagen Typ I

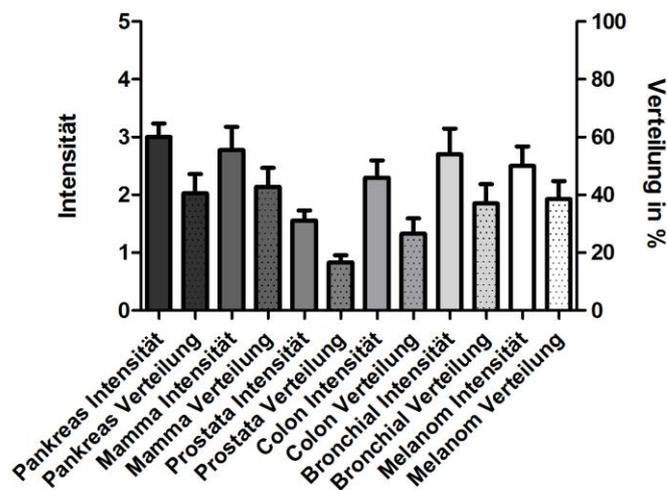


Abb 23: Färbeintensität und Verteilung von Kollagen Typ I. Die Prostatakarzinome PC3 und LNCAP weisen die geringsten Werte auf. Die Mammakarzinome T47d und MCF7 weisen die stärkste Färbeintensität von Kollagen Typ I auf.

4.7.2. Auswertung der Hyaluronan-Intensitäten

Die statistische Auswertung erfolgt mittels des Mann-Whitney -Test. Die Hyaluronanintensitäten ergeben signifikante Unterschiede bei dem Vergleich zwischen den Tumorentitäten Pankreaskarzinom, Prostatakarzinom, kleinzelliges Bronchialkarzinom und malignes Melanom. Bei den Mammakarzinomen ergeben sich signifikante Unterschiede bei dem Vergleich mit Prostatakarzinomen, Kolonkarzinomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen und malignen Melanomen. Die signifikanten Unterschiede ergeben sich zwischen den Tumorentitäten mit der höchsten Färbeintensität von Hyaluronan und den Entitäten mit der geringsten Intensität von Hyaluronan. Der Vergleich zwischen der hohen Färbeintensität der Pankreaskarzinome, und der geringen Färbeintensität der Colonkarzinome bildet eine Ausnahme. Alle weiteren Vergleiche ergeben keinen signifikanten Unterschied in der Intensität von Hyaluronan.

	Pankreas	Mamma	Prostata	Colon	Bronchial	Melanom
Pankreas	-----	kein signifikanter Unterschied P=0,5234	signifikanter Unterschied P=0,0113	kein signifikanter Unterschied P=0,0569	signifikanter Unterschied P=0,0456	signifikanter Unterschied P=0,0325
Mamma	-----	-----	signifikanter Unterschied P=0,0001	signifikanter Unterschied P=0,0065	signifikanter Unterschied P=0,0029	signifikanter Unterschied P=0,0002
Prostata	-----	-----	-----	kein signifikanter Unterschied P=0,9296	kein signifikanter Unterschied P=0,9633	kein signifikanter Unterschied P=0,1930
Colon	-----	-----	-----	-----	kein signifikanter Unterschied P=1,0000	kein signifikanter Unterschied P=0,5651
Bronchial	-----	-----	-----	-----	-----	kein signifikanter Unterschied P=0,5055
Melanom	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Tabelle 3: Darstellung der Signifikanz bei dem Vergleich von Hyaluronanintensitäten der Tumorentitäten. Die Erhebung erfolgte über einen Mann-Whitney-Test. Signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen den Entitäten mit der höchsten Färbeintensität von Hyaluronan und den Tumorentitäten mit der geringsten Färbeintensitäten von Hyaluronan.

4.7.3. Auswertung der Kollagen Typ I Intensitäten

Die statistische Auswertung erfolgt mittels Mann-Whitney-Test. Die statistische Auswertung der Kollagen Typ I-Intensitäten ergibt signifikante Unterschiede zwischen den Tumorentitäten Pankreaskarzinom und Prostatakarzinom, Mammakarzinom und Prostatakarzinom, Prostatakarzinom und malignes Melanom. Signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen den Tumorentitäten Pankreas- und Mammakarzinom, mit den höchsten Kollagen Typ I-Intensitäten, und den Prostatakarzinomen PC3 und LNCAP mit der geringsten Intensität von Kollagen Typ I. Die Bronchialkarzinome zeigen eine hohe Intensität von Kollagen Typ I, weisen aber keinen signifikanten Unterschied zu den Prostatakarzinomen auf.

	Pankreas	Mamma	Prostata	Colon	Bronchial	Melanom
Pankreas	-----	kein signifikanter Unterschied P=0,5426	signifikanter Unterschied P=0,0012	kein signifikanter Unterschied P=0,1003	kein signifikanter Unterschied P=0,6688	kein signifikanter Unterschied P=0,3015
Mamma	-----	-----	signifikanter Unterschied P=0,0169	kein signifikanter Unterschied P=0,4176	kein signifikanter Unterschied P=0,9665	kein signifikanter Unterschied P=0,7034
Prostata	-----	-----	-----	kein signifikanter Unterschied P=0,0712	kein signifikanter Unterschied P=0,0732	signifikanter Unterschied P=0,0467
Colon	-----	-----	-----	-----	kein signifikanter Unterschied P=0,5329	kein signifikanter Unterschied P=0,6937
Bronchial	-----	-----	-----	-----	-----	kein signifikanter Unterschied P=0,7853
Melanom	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Tabelle 4: Darstellung der Signifikanz bei dem Vergleich von Kollagen Typ I Intensitäten der Tumorentitäten. Die Prostatakarzinome PC3 und LNCAP weisen signifikante Unterschiede der Kollagen Typ I Intensitäten im Vergleich zu den übrigen Tumorentitäten (Pankreas, Mamma, Bronchial und Melanom) mit hohen Kollagen Typ I Intensitäten auf.

4.7.4. Wachstumsdauer und Durchschnittsgewicht

Die verschiedenen Zelllinien weisen unterschiedliche Wachstumseigenschaften auf. Auch innerhalb der Entitäten verhalten sich die unterschiedlichen Zelllinien verschieden. So wächst das Pankreaskarzinom 5072 mit durchschnittlich 195 Tagen deutlich länger als das Pankreaskarzinom 5061 mit 89 Tagen, wobei die Zelllinie 5072 ein Durchschnittsgewicht von 0,79 Gramm erreicht, während die Zelllinie 5061 ein Durchschnittsgewicht von 1,65 Gramm erreicht. Das Kolonkarzinom CaCo2 weist die längste Wachstumsdauer auf, und erreicht dabei das höchste Durchschnittsgewicht.

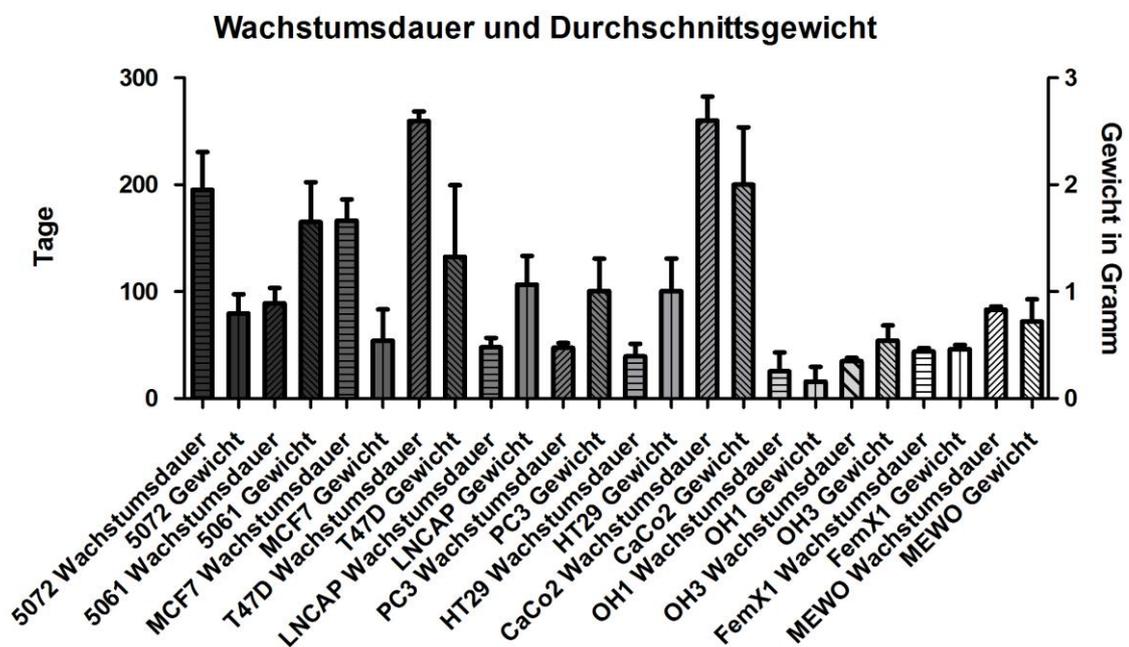


Abb 25: Durchschnittliche Wachstumsdauer und Durchschnittsgewicht zum Zeitpunkt der Entnahme des Primärtumors(entnommen aus dem OP-Protokoll des Instituts für experimentelle Morphologie, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf).

4.7.5 Beziehung von Wachstumsgeschwindigkeit und Intensität

Die Beziehung von Wachstumsgeschwindigkeit und der Intensitäten von Hyaluronan und Kollagen Typ I zeigt, dass tendenziell langsam wachsende Tumoren eine höhere Immunreaktivität auf Hyaluronan und Kollagen Typ I aufweisen.

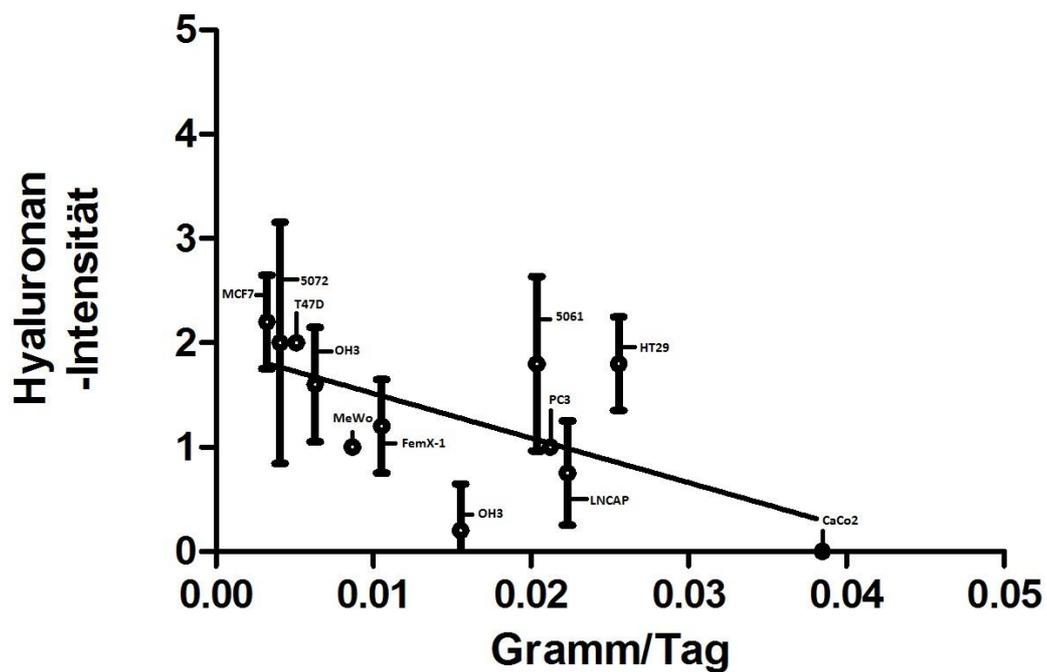


Abb.26: Beziehung von Wachstumsgeschwindigkeit (Gramm/Tag) und Hyaluronandeposition in der extrazellulären Matrix. Die Entitäten, die über der Durchschnittslinie liegen, entwickeln eine hohe Immunreaktivität gemessen an der Wachstumsgeschwindigkeit.

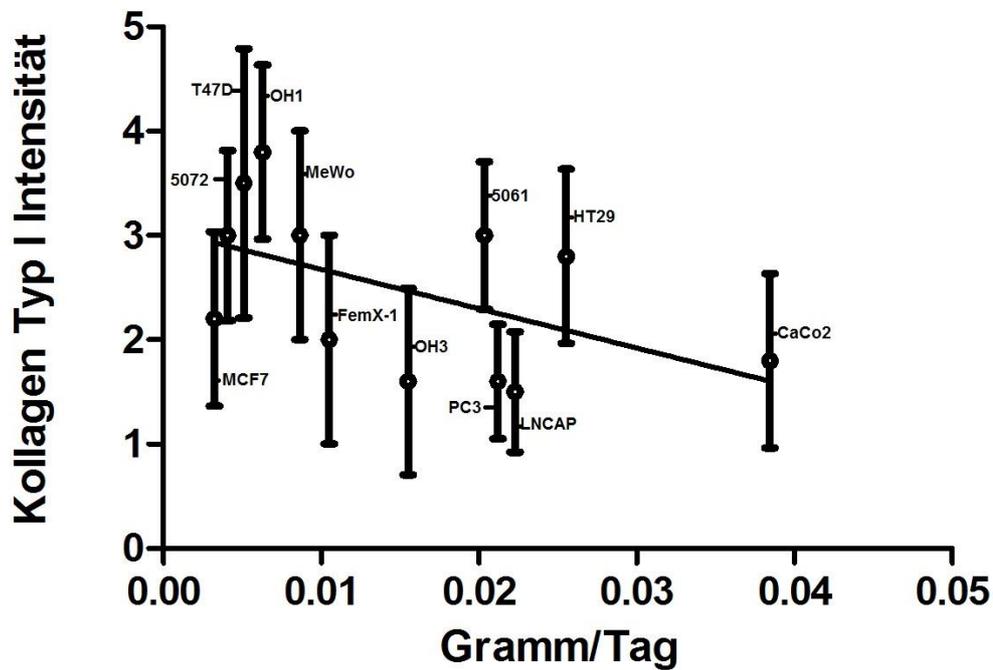


Abb.27: Beziehung zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Immunreaktivität von Kollagen Typ I. Die Entitäten die über der Durchschnittsline liegen, weisen eine hohe Immunreaktivität gegenüber Kollagen Typ I im Verhältnis zur Wachstumsgeschwindigkeit auf.

Die Pankreaskarzinome der Zelllinien 5072 und 5061 sowie die Mammakarzinome der Zelllinien MCF7 und T47D zeigen eine höhere Immunreaktivität von Hyaluronan und Kollagen Typ I in der Tumormatrix. Lediglich die Zelllinie 5061 weist sowohl bei der Hyaluronan als auch bei der Kollagen Typ I Deposition eine deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeit auf, als die Zelllinien 5072, MCF7 und T47D.

5. Diskussion

Hyaluronan und Kollagen Typ I sind wesentliche Bestandteile der extrazellulären Matrix von Tumoren, die nicht nur die mechanischen Eigenschaften (Wagner und Müller, 2010), sondern auch das Tumorstadium beeinflussen können (Toole, 2002). Der Anteil dieser beiden Makromoleküle in der extrazellulären Matrix des Tumors kann für die Einschätzung des biologischen Verhaltens und des Ansprechens auf Therapie interessant sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden Primärtumoren humaner Karzinomzelllinien, die in Scid-Mäusen gewachsen sind, auf die Immunreaktivität und Lokalisation von Hyaluronan und Kollagen Typ I untersucht. In der Literatur wurden bisher keine Entitäten übergreifenden Analysen der extrazellulären Matrix mit dem Schwerpunkt auf die Hyaluronan und Kollagen Typ-I Deponierung gemacht. Ziel der Untersuchung war es deshalb herauszufinden, ob es signifikante Unterschiede in der Immunreaktivität beider Substanzen zwischen den verschiedenen Tumorentitäten gibt. Die Untersuchung der 12 humanen Tumorzelllinien ergab, dass Mammakarzinome und Pankreaskarzinome in Xenotransplantationsversuchen eine gesteigerte Deponierung von Hyaluronan in der extrazellulären Matrix gegenüber den restlichen untersuchten Tumorentitäten aufweisen. Die Kollagen Typ I Deposition ist zwischen den untersuchten Entitäten homogener verteilt, mit den höchsten Werten bei den Pankreaskarzinomen. Die geringsten Werte wurden bei den Prostatakarzinomen beobachtet. Kollagen Typ I findet sich

hauptsächlich in den Septen bindegewebsreicher Tumoren, der Entitäten Pankreaskarzinom, Mammakarzinom und Bronchialkarzinom.

Entität	Pankreas	Mamma	Prostata	Colon	Bronchial	Melanom
Hyaluronan	1,9	2,1	0,875	0,9	0,9	1,1
Koll. Typ I	3,0	2,7	1,5	2,3	2,7	2,5

Tab.5: Durchschnittliche Färbeintensitäten von Hyaluronan und Kollagen Typ I.

Daraus folgern wir, dass es signifikante Unterschiede in der Deponierung von Hyaluronan und Kollagen Typ I zwischen den Entitäten gibt.

Zusätzlich wurde beobachtet, dass langsam wachsende Tumoren mehr Hyaluronan und Kollagen Typ I in ihrem Stroma deponieren als schnell wachsende Tumoren. So weisen die Pankreaskarzinome der Zelllinie 5072 nach einer durchschnittlichen Wachstumsdauer von 195 Tagen ein Durchschnittsgewicht von 0,79 Gramm auf. Dabei entwickeln sie eine Hyaluronandeponierung mit der Färbeintensität von durchschnittlich 2. Die Prostatakarzinome der Zelllinie LNCAP wuchsen im Durchschnitt 48 Tage, und erreichten dabei ein Gewicht von 1 Gramm. Dabei entwickelten sie eine durchschnittliche Hyaluronandeponierung mit der Färbeintensität von 0,75.

Es wird ein Zusammenhang zwischen der Deponierung von Hyaluronan und Kollagen Typ-I in der extrazellulären Matrix und den interstitiellen Flüssigkeitsdruck (IFP) in soliden Tumoren vermutet. Ein erhöhter IFP, der sich aus hydrostatischen und osmotischen Drücken zusammensetzt ist in soliden Tumoren erhöht (Heldin et al., 2004). Der erhöhte intratumorale

IFP reduziert den hydrostatischen Druckgradienten zwischen den intravasculären und extravasculären Tumoranteilen, sodass sie sich ausgleichen (Goel et al., 2011).

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Wasserretention durch Komponenten der extrazellulären Matrix, Leckagen der Blutgefäße und eine unzureichende lymphatische Drainage zu einem gesteigerten IFP in Tumoren beiträgt (Heldin et al., 2004). Weiter konnte untersucht werden, dass Hyaluronan als Komponente der extrazellulären Matrix durch die Eigenschaft der Wasserbindung eine wichtige Rolle in der Modulation des IFP einnehmen muss. So konnte in Xenotransplantationsversuchen, die Behandlung von humanen Osteosarkomen mit den Hyaluronan-degradierenden Enzymen, Hyaluronidasen (HYAL), der IFP um 63%-84%, 1 Stunde nach intratumoraler Injektion, gesenkt werden (Breeken et al., 1998).

Der erhöhte IFP in Tumoren erklärt eine limitierte Verteilung von Molekülen über das Tumolvolumen, weswegen es essentiell ist den IFP zu senken, um die Penetration von intravenös verabreichten Therapeutika zu verbessern (Heine et al., 2012). Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix kann also den IFP beeinflussen, und den Transport von Molekülen wie Chemotherapeutika reduzieren, was die Effektivität dieser Therapien senkt (Minchinton und Tannock, 2006).

Goel et al. (2011) verglichen IFP's verschiedener Tumorentitäten, die von unterschiedlichen Autoren veröffentlicht wurden, mit dem Ergebnis, dass maligne Melanome einen höheren IFP aufweisen, als Mammakarzinome. Die Ergebnisse unserer Arbeit würden einen höheren IFP bei den

Mammakarzinomen vermuten lassen, da diese Entität mehr Hyaluronan und Kollagen Typ I in der extrazellulären Matrix deponiert.

Das Glykosaminoglykan Hyaluronan ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix, das in zahlreichen Untersuchungen mit Tumorerkrankungen assoziiert wurde. Als aktiver Bestandteil der extrazellulären Matrix von Tumoren, beteiligt sich Hyaluronan an Entzündungsreaktionen, Angiogenese, Bindegewebsbildung und der Tumorprogression (Nikitovic et al., 2015). So kann Hyaluronan möglicherweise eine Rolle in der Tumorprogression spielen. Hyaluronan öffnet, über die Hydratation der extrazellulären Matrix, Raum für die Migration von Tumorzellen (Lokeshwar et al., 2001).

Eine direkte und indirekte Wirkung von Hyaluronan auf Krebszellen und Stromazellen, über die Interaktion mit dem membranständigen Rezeptor CD44, wird im Zusammenhang mit der Selbsterneuerung von Tumorstammzellen in der Literatur diskutiert (Chanmee et al., 2015).

Erhöhte Konzentrationen von Hyaluronan im Stroma konnten in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen, und mit einer schlechten Überlebensprognose assoziiert werden.

Auvinen et al. fanden heraus, dass es bei den untersuchten Mammakarzinomen einen Zusammenhang zwischen der Hyaluronankonzentration im Stroma, zell- assoziierten Hyaluronan, einer geringen Differenzierung, positiven axillären Lymphknoten und einer geringen Überlebenszeit der Patienten gibt (Auvinen et al., 2000). Ein Anstieg der Hyaluronandeposition in Mammakarzinomen konnte mit einer erhöhten Zellbeweglichkeit und metastatischem Verhalten assoziiert

werden (Kimata et al., 1983). Die Mammakarzinome deponierten in unserer Untersuchung viel Hyaluronan in der extrazellulären Matrix, wobei wir keine Aussage zum metastatischen Potential treffen können.

Eine Untersuchungen von duktalem Adenokarzinomen des Pankreas, die in genetisch veränderten Mäusen (KPC-Mäuse) gewachsen sind, zeigten eine deutlich erhöhte Hyaluronankonzentration im Vergleich zu gesundem Gewebe. Der Hyaluronananteil wurde in dieser Untersuchung hauptsächlich mit einem desmoplastischen Tumorstroma assoziiert (Jacobetz et al., 2012). Auch in unserer Untersuchung konnten wir eine hohe Deponierung von Hyaluronan in einem bindegewebsreichen Tumorstroma der Pankreaskarzinome feststellen.

Die malignen Melanomzelllinien Mewo und Femx-1 wurden auf ihr Wachstum und Bildung von Metastasen in einem Scid-Maus-Modell untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Zelllinie FemX-1 nur wenige Micrometastasen in der Lunge bei einer kurzen Wachstumszeit von 40 Tagen absetzt. Die Zelllinie Mewo entwickelt nach 90 Tagen größere Metastasen (Thies et al., 2007). Eine weiterführende Arbeit, die den Zusammenhang von Hyaluronan, Zellmigration und Metastasierung betrachtet, untersuchte die Hyaluronananteile in den gleichen Zelllinien, durch einen in Vitro-Versuch, mit dem Ergebnis, dass sich bei der Zelllinie Mewo kein Hyaluronan nachweisen ließ (Monz et al., 2008).

Die von uns untersuchten malignen Melanome der Zelllinien Mewo und FemX-1 zeigen nach dem Wachstum in einer SCID-Maus und der histologischen Aufbereitung eine durchschnittliche Färbeintensität des Hyaluronans von 1,1. Das Verhalten der Zelllinie Mewo könnte auf den

unterschiedlichen Versuchsaufbau zurückzuführen sein. Für die Deponierung von Hyaluronan scheint die extrazelluläre Matrix von entscheidender Bedeutung zu sein.

Die Prostatakarzinome unserer Untersuchung zeigten die geringste Deponierung von Hyaluronan im Tumorstroma im Vergleich zu den restlichen untersuchten Tumorentitäten. Andere Untersuchungen haben eine gesteigerte Hyaluronandeponierung in Prostatakarzinomen gegenüber gesundem Prostatagewebe beschrieben, wobei der Hyaluronananteil nicht durch eine histologische Untersuchung, sondern durch einen ELISA-ähnlichen Versuchsaufbau bestimmt wurde (Lokeshwar et al., 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass die Überlebensrate von Patienten mit kolorektalen Karzinomen, die eine hohe Hyaluronansynthese zeigen, schlechter ist, als die von Patienten mit Hyaluronan-negativen Tumoren (Ropponen und Tammi, 1998).

In unserer Untersuchung verhalten sich die Kolonkarzinome der Zelllinien HT29 und CaCo2 in Bezug auf die Hyaluronanproduktion sehr unterschiedlich, was auf einen Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und Hyaluronanproduktion hinweisen könnte. Die Kolonkarzinome der Zelllinie CaCo2 sind deutlich höher differenziert, als die Kolonkarzinome der Zelllinie HT29.

Das Strukturprotein Kollagen Typ I ist ein Bestandteil der ECM, welche die mechanischen Eigenschaften des Gewebes und die Malignität von Tumoren beeinflusst. Die Kollagendichte in Mammakarzinomen, als schlechter prognostischer Faktor, wurde in zahlreichen Studien untersucht.

So wurde gezeigt, dass eine erhöhte Kollagenkonzentration im Tumorstroma mit einem invasiven Phenotyp und einem vermehrten Aufkommen von Lungenmetastasen im Mausmodell korreliert (Provenzano et al., 2008). Die von uns untersuchten Mammakarzinome zeigen eine hohe Konzentration von Kollagen Typ I in den bindegewebsreichen Tumoren.

Untersuchungen haben gezeigt, dass mit zunehmender Dedifferenzierung von Pankreaskarzinomen die Immunreaktivität auf Kollagen Typ-I zunimmt, und die Verteilung der Kollagene ungeordneter wird (Brunner und Stöß, 2009). Auch unsere Untersuchung konnte eine starke Deponierung von Kollagen Typ I in beiden Pankreaskarzinomen nachweisen.

Es wurde beschrieben, dass ein dichtes Kollagennetzwerk in Tumoren die Penetration von Chemotherapeutika signifikant reduziert, und so die Effektivität dieser Therapien senkt (Diop-Frimpong et al., 2011).

Im Xenotransplantationsversuchen konnte eine Behandlung von kollagendichten Tumoren mit Kollagenasen zu einer erhöhte interstitielle Diffusionsrate von IgG führen (Netti et al., 2000). Eine weitere Studie konnte feststellen, dass der Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonist (AT1-Antagonist) Losartan®, die Synthese von Kollagen Typ I durch karzinom-assoziierten Fibroblasten hemmen kann und die Verteilung von Chemotherapeutika, durch die Abnahme der Kollagendichte, zunimmt (Diop-Frimpong et al., 2011).

In unserer Untersuchung konnten wir signifikante Unterschiede, bei den unterschiedlichen Tumorentitäten, bei der Deponierung von Hyaluronan und Kollagen Typ I in der extrazellulären Matrix feststellen. Die Entitäten

des Mammakarzinoms und Pankreaskarzinoms zeichnen sich im Vergleich zu den Entitäten des Prostatakarzinoms und Kolonkarzinoms durch eine hohe Deponierung von Hyaluronan und Kollagen Typ I aus. Es müssen weitere Untersuchungen den Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad der Tumoren und der Immunreaktivität von Hyaluronan und Kollagen Typ I klären. Auch muss man der Beeinflussung der Synthese beider Substanzen, und somit die Veränderung des interstitiellen Flüssigkeitsdrucks weiter Beachtung schenken, um in Zukunft die Therapiebedingungen bei Tumoren mit hohem IFP zu verbessern. Die Modulation der extrazellulären Matrix, und somit das Penetrationsverhalten von Molekülen, wird ein weiterer Schritt zur Verbesserung der Effektivität von Chemotherapeutika darstellen.

6.Zusammenfassung

Die Makromoleküle Hyaluronan und Kollagen Typ I sind Bestandteile von gesunden und pathologisch veränderten Gewebe. In Tumoren konnte beobachtet werden, dass die Synthese dieser beiden Substanzen erhöht sein kann, was Einfluss auf das biologische Verhalten nimmt.

Eine erhöhte Hyaluronansynthese in humanen Tumoren wird mit einem aggressiveren Verhalten und einer schlechteren Überlebensprognose assoziiert. Eine gesteigerte Synthese von Kollagen Typ I verändert die mechanischen Eigenschaften des Gewebes und limitiert das Penetrationsverhalten von Molekülen durch die extrazelluläre Matrix.

Der interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP) wird von der Wasserbindung des Hyaluronan und der mechanischen Stabilität des Kollagen Typ I reichen Tumorstromas erhöht.

In dieser Untersuchung wurden 12 humane Tumoren verschiedener Entitäten auf die Deposition und Verteilung von Hyaluronan und Kollagen Typ I in Xenograftmodellen untersucht. Die verwendeten Tumorzelllinien entstammen den Entitäten: Mammakarzinom, Pankreaskarzinom, Prostatakarzinom, Colonkarzinom, malignes Melanom und kleinzelliges Bronchialkarzinom. Die untersuchten Mamma- und Pankreaskarzinome stellten sich nach immunhistochemischen Färbetechniken und Analyse durch Lichtmikroskopie, als die Entitäten heraus, die besonders viel Hyaluronan und Kollagen Typ I in der extrazellulären Matrix deponieren.

Durch diese Befunde können Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Tumoren, die Prognose und den Therapieerfolg durch

Chemotherapeutika gemacht werden. Die Modulation der extrazellulären Matrix könnte die Effektivität von medikamentösen Therapien erhöhen.

7. Literaturverzeichnis

Abecassis I., Olofsson B., Schmidt M., Zalcmann G., Karniguian A. (2003). RhoA induces MMP- expression at CD44 lamellipodial focal complexes and promotes HMEC-1 cell invasion. *Experimental Cell Research* 291, 363-376

Auvinen P., Tammi R., Parkkinen J., Tammi M., Agren U., Johansson R., Hirvikoski P., Eskelinen M., Veli-Matti K. (2000) Hyaluronan in peritumoral Stroma and malignant Cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *The American Journal of Pathology Volume 156, Issue 2, Feb. 2000, 529-536*

Brekken, C., Lang Davies C. (1998). Hyaluronidase reduces the interstitial fluid pressure in solid tumors in non-linear concentration-dependent manner. *Cancer Letters* 131, 11 September, 65-70

Brunner J., Stöß H. (2009) Immunhistochemische Untersuchungen zur Zusammensetzungen der Extrazellulärmatrix beim Pankreaskarzinom. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* , 7/2009, 7-12

Campbell N.A., Mathieu R. (1995) NA. Biology: Editions du Renouveau Pedagogique, 1995

Chanmee T., Ontong P., Kimata K., Itano N.(2015) Key roles of hyaluronan and its CD44 receptor in stemness and survival of cancer stem cells. *Frontiers in Oncology Volume 5, August 2015, Article 180*

Clifford J.W., Haiyong H., Richard G. P., Galen H., Von Hoff D. (2011). Targeting the tumor microenvironment in cancer: Why hyaluronidase deserves a second look. *Cancer Discovery September 2011 1; 291-296*

Diop-Frimpong B., Chauhan V., Krane S., Boucher Y., Jain R.J. (2010) Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *PNAS February 15, 2011, Vol 108 No.7 , 2909-2914*

Furlan S., La Penna G., Perica A., Cesaro A. (2005) Hyaluronan chain conformation and dynamics. *Carbohydrate RESEARCH* 340 (2005) 959-970

Girish K.S., Kemparaju K. (2007) The magic glue Hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences Vol.80 Issue 21, 1 May 2007, 1921-1943*

Goel S., Duda D.G., Xu L., Munn L.L., Boucher Y., Fukumura D., Jain R.K. (2011)

Normalization of vasculature for Treatment of cancer and other Diseases
Physiol Rev 91, 2011, 1071-1121

Hanahan D., Weinberg R.A. (2011)

Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, March 4, 2011, 646-670

Heine M., Freund B., Nielsen P., Jung C., Reimer R., Hohenberg H., Zangmeister-Wittke U., Wester H.-H., Lüers G.H., Schumacher U.(2012)

High Interstitial Fluid Pressure is Associated with Low Tumor Penetration of Diagnostic Monoclonal Antibodies Applied for Molecular Imaging Purposes. *PLoS ONE*, Volume 7, May 2012, e36258

Heldin C.H., Rubin K., Pietras K., Ostman A. (2004)

High interstitial fluid pressure-an obstacle in cancer therapy.
Nature Reviews Cancer 4, October 2004, 806-813

Hynes R.O. (2009)

The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils.
Science 27 Vol.326 No.5957, November 2009, 1216-1219

Itano N., Kimata K. (2002)

Mammalian Hyaluronan Synthase. *IUBMB Life*, 54: 195-199

Jacobetz M.A., Chan D.S., Neesse A., Bapiro T.E., Cook N., Frese K., Feig C., Nakagawa T., Caldwell M.E., Zecchini H.I., Lolkema M.P., Jiang P., Kultti A., Thompson C.B., Maneval D.C., Jodrell D.I., Frost G.I., Shepard H.M., Skepper J.N., Tuveson D.A. (2012)

Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 2013, 62, 112-120

Kimata K., Honma Y., Okayama M., Oguri K., Hozumi M., Suzuki S.(1989)

Increased Synthesis of Hyaluronic Acid by Mouse Mammary Carcinoma Cell Variants with High Metastatic Potential. *Cancer Research* 43, 1347-1354

Lennon F.E., Singelton P.A. (2011)

Hyaluronan regulation of vascular integrity. *American Journal of Cardiovascular Disease* 2011;1(3): 200-213

Li H., Fan X., Houghton J. (2007)

Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer
Journal of cellular Biochemistry Vol. 101, Issue 4, 1 July 2007, 805-815

Lokeshwar V.B., Rubinowicz D., Schroeder G.L., Forgacs E., Minna J.D., Block N.L., Nadji M., Lokeshwar B.L. (2001)

Stromal and epithelial Expression of Tumor Markers Hyaluronic Acid and HYAL1 Hyaluronidase in Prostate Cancer. *The Journal of Biological Chemistry Vol.276, No.15 January 2001, 11922-11932*

Mierke C.T. (2011)

Cancer Cells Regulate Biomechanical Properties of Human Microvascular Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry Vol.286, No.46, 40025-40037*

Minchinton A.I., Tannock I.F. (2006)

Drug penetration in solid tumors
Nature Reviews Cancer Vol.6, August 2006, 583-592

Monz K., Maas-Kück K., Schumacher U., Schulz T., Hallmann R., Schnäker E.M., Schneider S.W., Prehm P. (2008)

Inhibition of Hyaluronan Export Attenuates Cell Migration and Metastasis of Human Melanoma. *Journal of Cellular Biochemistry 105, 2008, 1260-1266*

Netti P.A., Berk D.A., Swartz M.A., Grodzinsky A.J., Jain R.K. (2000)

Role of Extracellular Matrix Assembly in Interstitial Transport in solid Tumors. *Cancer Research 60, May 1, 2000, 2497-2503*

Nikitovic D., Tzardi M., Berdiaki A., Tsatsakis A., Tzanakakis G.N. (2015)

Cancer microenvironment and inflammation: role of Hyaluronan
Frontiers in IMMUNOLOGY Vol.6, Article 169, April 2015

Pardue E.L., Ibrahim S., Ramamuthi A. (2008)

Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenetic tissue engineering. *Organogenesis 4(4) 203-204*

Peters B.A., Diaz Jr. L.A., Polyak K., Meszler L., Romans K., Guinan E.C., Antin J.H., Myerson D., Hamilton S.R., Vogelstein B., Kinzler K.W., Lengauer Ch. (2005)

Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumorvasculatur. *Nature medicine 11, 261-262*

Pluen A., Boucher Y., Ramanujan S., McKee T.D., Gohongi T., Tomaso di E., Brown E.B., Izumi Y., Campbell R.B., Berk D.A., Jain R.J. (2001)

Role of tumor-host interaction in interstitial diffusion of macromolecules: Cranial vs. subcutaneous tumors. *PNAS Vol.98, No.8, 4628-4633*

Prehm P. (2008)

Hyaluronan, the tissue-Expander: ``Go Away, now I am coming!``
BIOspektrum 5, 473-476

Provenzano P.P., Inman D.R., Eliceiri K.W., Knittel J.G., Yan L., Rueden C.T., White J.G., Keely P.J. (2008)

Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression
BMC Medicine 2008, 6:11, 1741-7015

Richter U., Wicklein D., Geleff S., Schumacher U. (2012)

The interaction between CD44 on tumor cells hyaluronan under physiologic flow conditions:implication for metastasis formation
Histochemistry and Cell Biology May 2012, Volume 137, 687-695

Ropponen K., Tammi M., Parkkinen J., Eskelinen M., Tammi R., Lipponen P., Agren U., Alhava E., Kosma V.M. (1998)

Tumor Cell-associated Hyaluronan as an unfavorable Prognostic Factor in Colorectal Cancer. *Cancer Research* 58, 342-347

Schulz T., Schumacher U., Prehm P. (2007)

Hyaluronan Export by the ABC Transporter MRP5 and ist Modulation by intracellular cGMP. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 20999-21004

Singelton P.A., Dudek S.M., Ma S.F., Garcia J.G.N. (2006)

Transactivation of Sphingosine 1-Phosphate Receptors is Essential for Vascular Barrier regulation: Novel Role for Hyaluronan and CD44 Receptor Family. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 128, No. 45, 34381-34393

Singelton P.A. (2014)

Hyaluronan Regulation of Endothelial Barrier Function in Cancer
Advances in Cancer Research Vol. 123, 191-209

Sironen R.K., Tammi M., Auvinen P.K., Antilla M., Kosma V-M. (2011)

Hyaluronan in human malignancies.
Experimental Cell Research Volume 317, Issue 4, 383-391

Thies A., Mauer S., Fodstad O., Schumacher U. (2007)

Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *British Journal of Cancer* 96, 2007, 609-616

Toole B.P. (2002)

Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology* Vol.12 No.3, 37R-42R,2002

Wagener Ch., Müller O. (2010)

Molekulare Onkologie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag

West D.C., Kumar S. (1989)

The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity
Experimental Cell Research Volume 183, Issue 1, 179-196

Willenberg A., Saalbach A., Simon J.C., Anderegg U. (2011)
Melanoma Cells Control HA Synthesis in Peritumoral Fibroblasts via
PDGF-AA and PDGF-CC: Impact on Melanoma Cell Proliferation
Journal of Investigative Dermatology(2012) 132, 385-393

8. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher, Herrn Dr. Markus Heine und dem Team des Institutes für experimentelle Morphologie für die intensive Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit bedanken.

Ein weiterer Dank gilt meiner Familie, meinem Vater für die Unterstützung in der Praxis und Motivation, meiner Mutter und meiner Schwester für die seelische Unterstützung.

9. Curriculum vitae

Kristof Gebauer
Graumannsweg 36
22087Hamburg

Geburtsdatum: 22.01.1982
Geburtsort: Reinbek bei Hamburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Sprachkenntnisse

Muttersprache: deutsch
Gute Kenntnisse: englisch

Schulbildung

06/2002 Abitur Gymnasium Lohbrügge Hamburg

Zivildienst

08/2002-05/2003 Krankenhaus St. Adolfstift Reinbek

Studium

04/2004-12/2009 Studium der Zahn-Mund- und Kieferheilkunde an der
Universität zu Köln.

Staatsexamen bestanden am 07.12.2009

Beruflicher Werdegang

04/2010-05/2011 Vorbereitungsassistent und Weiterbildung Oralchirurgie
Helios Kliniken Schwerin Abt. MKG-Chirurgie

06/2011-04/2012 Vorbereitungsassistent Praxis Dr. Gebauer Hamburg-
Bergedorf

05/2012-04/2014 angestellter Zahnarzt und Weiterbildung Oralchirurgie
Praxis für MKG-Chirurgie Prof.(Haibusak)MD.DDS(Gus)
George Khoury

05/2012-04/2014 Entlastungsassistent Praxis Dr. Gebauer Hamburg-
Bergedorf

05/2014-12/2014 angestellter Zahnarzt Praxis Dr. Gebauer Hamburg-
Bergedorf

12/2014 Ernennung zum Fachzahnarzt für Oralchirurgie durch die
Zahnärztekammer Hamburg

Seit 01/2015 Übernahmen der Praxis Dr. Gebauer in Hamburg
Bergedorf

10. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, Kristof Gebauer geb. 22.01.1982, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt habe.

Andere Hilfsmittel, als die von mir angegebenen Quellen, wurden nicht verwendet.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit keiner anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt, oder mich um ein weiteres Promotionsverfahren bemüht habe.

Hamburg, den

Kristof Gebauer