

**Hyaluronsäurestoffwechsel von Stromafibroblasten um
Basalzellkarzinome innerhalb und außerhalb der embryonalen
Fusionszone des Mittelgesichts**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Johanna Maria Kratzsch

geb. am 12.11.1985 in Leipzig

angefertigt an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig
im Fachbereich Dermatologie

Betreuer: PD Dr. rer. nat. habil U. Anderegg

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.03.2011

Bibliographische Beschreibung

Johanna Maria Kratzsch

Untersuchungen zum Hyaluronsäurestoffwechsel von Stromafibroblasten um Basalzellkarzinome innerhalb und außerhalb der embryonalen Fusionszone des Mittelsichts.

Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, Dissertation
64 S., 94 Lit., 17 Abb., 6 Tab.

Referat: Das Basalzellkarzinom (BZK) der Haut gilt als einer der häufigsten semimaligen Tumoren. Trotz der niedrigen Metastasierungsrate von $< 0,1\%$ können BZK schwerwiegende Infiltrationen und Destruktionen knorpeliger sowie knöcherner Strukturen verursachen. Für die Tumorentstehung ist vor allem die kumulative UVB-Dosis in Kindheit und Adoleszenz bedeutsam. Aber auch die Embryonalentwicklung scheint eine Rolle in der Pathogenese von Tumoren zu spielen. Die so genannte embryonale Fusionszone (eFZ) entsteht zwischen der 5-10 Entwicklungswoche durch die Verschmelzung der fünf Gesichtswülste. Es konnte gezeigt werden, dass BZK innerhalb dieses Kompartiments nicht nur gehäuft auftreten sondern auch durch ein ausgeprägtes Tiefenwachstum charakterisiert sind. Als mögliche Ursache für das verstärkt invasive Wachstum von BZK innerhalb der eFZ wurden Änderungen im Hyaluronsäure (HA)-Stoffwechsel der Stromazellen angenommen. Neben der Bedeutung in der Embryonalentwicklung und bei der Geweberegeneration zeigten verschiedene Studien zudem die essentielle Rolle von HA im Rahmen von malignen Zelltransformationen. Vermehrte HA-Ablagerungen in der Tumorumgebung oder erhöhte HA-Serumkonzentrationen wurden bei einer Vielzahl von Tumoren als Zeichen einer fortschreitenden Tumorprogression beschrieben. Um den HA-Stoffwechsel von Stromafibroblasten um BZK gezielt zu untersuchen, wurden der HA-Gehalt, die HA-Größe und die exprimierten Enzyme des HA-Stoffwechsels in Abhängigkeit von ihrer Lokalisationen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass sowohl innerhalb als auch außerhalb der eFZ vergleichbare Mengen und Polymergrößen von HA sezerniert werden. Molekularbiologische Untersuchungen an expandierten Fibroblasten aus Biopsien verschiedener Lokalisationen zeigten ebenfalls keine Unterschiede in der Expression von mRNA der HA Stoffwechsellzyme nach Herkunft der Fibroblasten.

Somit wird geschlussfolgert, dass HA zwar auch im Stroma von BZK gebildet wird, der HA-Stoffwechsel von Stromafibroblasten jedoch kein Merkmal ist, das mit dem vermehrten Auftreten und invasiven Wachstum von BZK im Bereich der embryonalen Fusionszone des Mittelgesichts korreliert.

INHALTSVERZEICHNIS**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... III**

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Das Basalzellkarzinom	- 1 -
1.1.1	Epidemiologie.....	- 1 -
1.1.2	Ätiologie	- 1 -
1.1.3	Klinik	- 2 -
1.1.4	Diagnostik und Therapie.....	- 3 -
1.2	Die embryonale Fusionszone	- 5 -
1.2.1	Die Entwicklung des Mittelgesichts	- 5 -
1.2.2	Die Rolle der Embryonalentwicklung in der Pathogenese von Tumoren.....	- 6 -
1.2.3	Korrelation zwischen der anatomischen Verteilung von Basalzellkarzinomen und der embryonalen Fusionszone.....	- 7 -
1.2.4	Korrelation zwischen dem Tiefenwachstum von Basalzellkarzinomen und der embryonalen Fusionszone.....	- 8 -
1.3	Interaktion von Tumor- und Stromazellen im Rahmen der Tumorprogression	- 9 -
1.3.1	Die Aktivierung von Stromafibroblasten in Tumoren	- 9 -
1.3.2	Das Polymer Hyaluronsäure	- 10 -
1.3.3	Die Tumor-stimulierende Wirkung von Hyaluronsäure	- 11 -
1.4	Fragestellung	- 13 -
2	MATERIAL UND METHODEN	- 14 -
2.1	Material.....	- 14 -
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	- 14 -
2.1.2	Chemikalien und Medien.....	- 16 -
2.1.3	Lösungen und Puffer.....	- 17 -
2.1.4	Primer	- 19 -
2.1.5	Immunreagenzien.....	- 21 -
2.1.6	Sonstige Materialien, Reagenzien und Kits	- 21 -
2.1.7	Patientenproben	- 22 -
2.2	Methoden	- 22 -
2.2.1	Zellkultur	- 22 -
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	- 26 -
2.2.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	- 31 -
2.2.4	Immunhistochemische Methoden	- 32 -
2.2.5	Graphische Auswertung und statistische Analyse	- 33 -
3	ERGEBNISSE	- 34 -
3.1	Untersuchung der Hyaluronsäure-Verteilung im Gewebe mittels Hyaluronsäure-Bindungsprotein	- 34 -
3.2	Quantifizierung der Hyaluronsäure-Konzentration mittels ELISA.....	- 36 -
3.3	Untersuchung der Größe der Hyaluronsäure-Moleküle mittels „Westernblot“ ...	- 37 -

3.4	Nachweis der Hyaluronsäure-verstoffwechselnden Enzyme mittels Realtime qPCR	- 38 -
3.5	Ansprechrate der Fibroblasten auf TGF- β_1 und PDGF-BB	- 40 -
4	DISKUSSION	- 45 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 54 -
6	LITERATURVERZEICHNIS	- 55 -
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 62 -
8	TABELLENVERZEICHNIS	- 64 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Österreich
aeFZ	Außerhalb der eFZ
AU	<i>arbitrary units</i>
AUS	Australien
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BZK	Basalzellkarzinom
C	Cytosin
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CH	Schweiz
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	Deutschland
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DEPC	Diethylpyrocarbonat
3D-Histologie	Dreidimensionale Histologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eFZ	Embryonale Fusionszone
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FB	Fibroblasten
bFGF	<i>basal fibroblast growth factor</i>
FKS	Fötale Kälberserum
g	mittlere Erdschwerebeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat

HA	Hyaluronsäure
HA-BP	Hyaluronsäure Bindeprotein
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
HOX	homeobox
HYAL	Hyaluronidase
mA	Milliampere
MMP-1	<i>matrix metalloproteinase-1</i> (Matrixmetalloproteinase-1)
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
MG	Molekulargewicht
MM	Malignes Melanom
NF	Übertragen: „Generationszeit“
NL	Niederlande
NTC	<i>negative template control</i>
OP	Operation
p-Wert	<i>probability -value</i> (Signifikanzwert)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatpuffer)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF-BB	<i>Platelet-derived growth factor-BB</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (Wasserstoffstärke)
Ptch-Gen	Patched-Gen
RF	Referenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNAase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Schweden
SPP	Sörensen Phosphat Puffer
T	Thymin
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TM	Tumor
TMMR	Totale Mesometriale Resektion
tp53	Tumorsuppressorgen 53
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan

U	<i>units</i> (Enzymeinheiten)
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i> (Vereinigte Staaten von Amerika)
UV	ultraviolett
V	Volt
VM	Vollmedium

1 EINLEITUNG

1.1 Das Basalzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Basalzellkarzinom (BZK), ein Subtyp der nichtmelanozytären Hauttumoren, gilt in der kaukasischen Bevölkerungsgruppe als einer der häufigsten semimalignen Tumoren¹⁻³. Das Durchschnittsalter für Betroffene liegt derzeit zwischen dem 6ten und 8ten Lebensjahrzehnt, wobei aber eine Tendenz zu einem jüngeren Manifestationsalter erkennbar ist. Trotz der niedrigen Metastasierungsrate von < 0,1%⁴ können BZK schwerwiegende Infiltrationen und Destruktionen knorpeliger sowie knöcherner Strukturen verursachen. Die Zahl der betroffenen Patienten (Inzidenz in Deutschland 100 000 neue Fälle pro Jahr) nimmt kontinuierlich zu, was neben weiteren Aspekten unter anderem weltweit auf eine Zerstörung des Ozonloches und der damit verbundenen steigenden karzinogenen UV-Belastung zurückzuführen ist⁵. Dennoch sind diese Hauttumore in frühen Stadien mit einer fast 100%igen Heilungschance sehr gut behandelbar, so dass die Mortalität nachweislich gering ist⁶. In einer Studie aus den Niederlanden wurde vorhergesagt, dass sich bis zum Jahr 2015 die Zahl der Patienten mit BZK um nahezu 80% erhöhen wird⁷. Aufgrund der steigenden Inzidenz von weltweit 3-10% pro Jahr^{1,2,8} und der kostspieligen Behandlung stellen BZK heutzutage ein vorwiegend ökonomisches Problem dar, dem ganz entscheidend durch primäre und sekundäre präventive Maßnahmen vorgebeugt werden muss⁹. Die Früherkennung von BZK durch verschiedene Klassen von neuen Biomarkern steht aus diesem Grund zunehmend im wissenschaftlichen Interesse⁹.

1.1.2 Ätiologie

Nach heutigem Kenntnisstand stammen BZK von epidermalen Vorläufer- oder Stammzellen der äußeren Haarwurzelscheide ab¹⁰. Dies erklärt das ausschließliche Auftreten der Tumore an behaarten Hautarealen. Weiterhin treten die bevorzugt bei hellhäutigen Menschen vorkommenden Karzinome zu mehr als 80% im Kopf-Hals Bereich auf¹¹. Für die Entstehung bösartiger Hauttumore werden sowohl familiäre als auch Umweltfaktoren verantwortlich gemacht. Im Fall eines BZK ist in erster Linie die kumulative UV-Exposition in Kindheit und Adoleszenz entscheidend. Ultraviolette Strahlung führt bekanntermaßen zu DNA-Schäden, die im Erkrankungsfall nicht mehr durch zelluläre Reparatursysteme oder über den Weg der Apoptose behoben werden können. Molekulargenetisch sind BZK durch eine aberrante

Aktivierung des Sonic-Hedgehog-Signalweges charakterisiert, die in der Mehrzahl der Tumore durch Mutationen in den Genen *ptch* und *smoh* hervorgerufen werden¹². Zusätzlich finden sich in etwa der Hälfte der Fälle Mutationen im Tumorsuppressorgen *tp53*, die meist UVB-typische C→T-Transitionen sind¹². Dabei ist das mutagene Potential von UVB-Strahlung 10000 Mal höher als von UVA-Strahlung, die als weniger gefährlich gilt¹³. Neben der UV-Exposition spielt wie bereits erwähnt auch die genetische Disposition mit geringer Hautpigmentierung eine Rolle bei der Tumorentstehung¹⁴. Aber auch Narben¹⁵, Nävi sebacei¹⁶, Arsenbelastungen¹⁷ und eine langfristige medikamentöse Immunsuppression¹⁸ sind als ätiologische Faktoren bekannt. Im Rahmen von assoziierten Syndromen wie Xeroderma pigmentosum¹⁹, Basalzellnävussyndrom²⁰ und Albinismus²¹ steigt nachweislich das Risiko an BZK zu erkranken.

1.1.3 Klinik

BZK treten zumeist als flach erhabene, umschriebene, gelblich-rötliche Papeln mit einem perlschnurartigen Randsaum in Erscheinung und können in fortgeschrittenen Stadien in ulzerierende Läsionen übergehen. Weitere typische Merkmale sind eine atrophisch glänzende Oberfläche der Plaques oder Knoten sowie das Vorhandensein von atypischen, meist bizarr konfigurierten Tumorgefäßen, die sich auflichtmikroskopisch darstellen lassen und von großem diagnostischen Wert sind²². Insbesondere BZK zeigen häufig eine ausgesprochen unregelmäßige und z.T. klinisch nicht erkennbare Ausbreitung („Eisenberg-Phänomen“). Es lassen sich, wie in Tabelle 1 dargestellt, grob folgende klinische Typen unterscheiden²³.

Tabelle 1: Subtypen des BZK²³

Klinische Typen	Merkmale
<ul style="list-style-type: none"> • Noduläres BZK 	Sehr häufig, „klassische“ Form, meist im Gesicht lokalisiert, knotenförmiges Wachstum, hautfarben bis rötlich, Teleangiektasien, Randwall
<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Nodulär-zystisches BZK</i> 	Durchscheinende seröse oder muzinöse kleine Zysten
<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Pigmentiertes BZK</i> 	Stark pigmentiert (Pigmentierung auch bei anderen Formen möglich, aber am häufigsten bei nodulären BZK), DD Malignes Melanom
<ul style="list-style-type: none"> • Oberflächliches BZK (auch Rumpfhautbasaliom) 	Häufig, oft multipel vorkommend, kleiner, scharf begrenzter, flacher, erythrosquamöser, manchmal mit Kruste bedeckter Tumor, bei

<ul style="list-style-type: none"> • Sklerosierendes BZK (auch Sklerodermiformes Basaliom) • Ulzerierendes BZK 	<p>Frühformen häufig keine Knötchen oder Teleangiektasien, dadurch leicht übersehbar</p> <p>Selten, schlecht erkennbar, wächst fingerförmig, desmoplastisch in der Dermis, Fehlen typischer BZK-Zeichen, ähnlich schrumpfender Narbe, Tumorgrenzen klinisch nicht sicher beurteilbar</p> <p>Schmerzlose Ulzerationen, zwei Formen: Ulcus rodens (flächige Ulzeration), Ulcus terebrans (tiefe Ulzeration)</p>
--	---

1.1.4 Diagnostik und Therapie

BZK lassen sich größtenteils klinisch diagnostizieren und standardgemäß mit Hilfe einer Biopsie oder vollständigen Exzision eindeutig identifizieren. Histologisch imponieren sie als solide scharf abgrenzbare basophile Epithelstränge aus zytoplasmaarmen Zellen mit rundlichen bis ovalen dunklen Kernen, die sich randständig palisadenartig formieren²². Therapeutisch zählt die operative Entfernung mit histologischer Absicherung bis heute als Goldstandard der unterschiedlichen Therapiemodalitäten. Als Alternativtherapeutika kommen eine medikamentöse Behandlung mit Imiquimod und 5-Fluorouracil, Strahlentherapie oder lokal destruierende Verfahren wie Kürettage, Kryotherapie, Lasertherapie und photodynamische Therapie in Frage²⁴. Im Folgenden soll das gängige Operations-Verfahren in der Behandlung von BZK, welches ebenfalls für die Exzision der Tumorproben in dieser Studie zur Anwendung kam, näher beleuchtet werden.

Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie: 3D-Histologie

Trotz der großen Palette an Therapiemöglichkeiten stellen mikroskopisch kontrollierte chirurgische Verfahren (MKC) das Standardvorgehen in der Behandlung von BZK dar. Es lassen sich verschiedene Operationstechniken unterscheiden²⁵. Die in der vorliegenden Studie angewandte Technik zur Resektion von BZK wurde mit Hilfe der 3D-Histologie durchgeführt (siehe Abbildung 1). Dies ist eine Modifikation der sogenannten Mohs-Technik und entspricht ihr grundsätzlich in ihren Zielen und Prinzipien. Die Vorteile gegenüber der konventionellen Chirurgie liegen dabei in dem besonders Gewebe sparendem Vorgehen, dem damit verbundenen guten kosmetischen Resultaten sowie der geringen Tumorrückkehrate^{26,27}. Zunächst wird der makroskopisch sichtbare Anteil des Tumors farbig markiert und im nächsten Schritt unter sterilen Bedingungen en bloc exzidiert. Intraoperativ wird zur topographischen Orientierung ein Einschnitt oder eine Fadenmarkierung an definierter Stelle,

meist bei 12 Uhr (Orientierung Kopfmittle kranialster Punkt), vorgenommen. Anschließend werden wie in Abbildung 1 ersichtlich die Tumorränder mit einem Sicherheitsabstand von 2-3 mm entlang der Quadranten 0-3, 3-6, 6-9, 9-12 und der Tumorgrund abpräpariert (Quadrantentechnik). Eine Farbmarkierung des entfernten Gewebes ermöglicht bei der späteren histologischen Untersuchung eine genaue topographische Orientierung. Der Exzisionsdefekt kann anschließend entweder direkt geschlossen oder durch geeignete Schutzverbände provisorisch gedeckt werden. Die sechs entnommenen Gewebeproben werden nun histologisch aufgearbeitet, sequenziell geschnitten und pathologisch untersucht. In der Regel erfolgt eine Formalinfixierung des entfernten Gewebes mit darauf folgender Paraffineinbettung. Eine Kryostataufarbeitung wäre ebenfalls denkbar. Laut jüngsten Studien ist es unter Zuhilfenahme des *konfokalen Fluoreszenz-Laser-Scan Mikroskops (FLSM)* möglich OP-Präparate in wesentlich kürzerer Zeit zu evaluieren²⁸. Beim Monitoring von Exzidaten mittels FLSM wurden BZK mit einer Sensitivität von 96,6% und einer Spezifität von 89,2% detektiert²⁸. Demnach stellt die FLSM eine Alternative zur konventionellen Histopathologie dar. Erreicht der Tumor in den histologischen Schnittpräparaten die Exzidatschnitttränder, wird am Exzisionsdefekt die tumor-positive Randzone oder der Wundgrund topographisch exakt identifiziert und nachexzidiert bis die vollständige Entfernung von Tumorgewebe sichergestellt ist. Der Wundverschluss kann anschließend mittels plastisch-rekonstruktiver Verfahren, freier Hauttransplantation oder Sekundärheilung erfolgen.

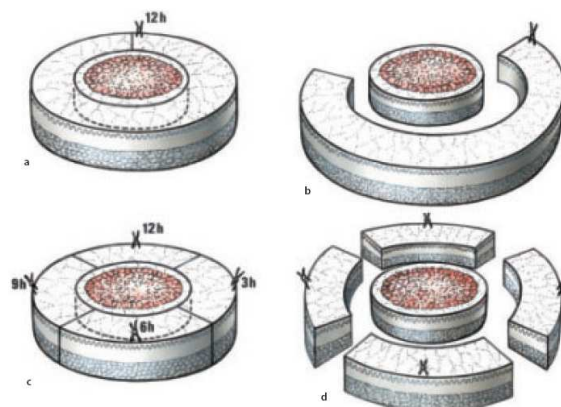


Abbildung 1: Prinzip der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie: 3D-Histologie²⁹.

Die Quadrantentechnik:

a, b Markierung bei 12 h und zirkulärer Randschnitt

c, d Mehrfache Fadenmarkierung und entsprechende Randschnitte.

1.2 Die embryonale Fusionszone

Die embryonale Fusionszone (eFZ) gilt als Relikt der Gesichtsentwicklung des Menschen. Sie entsteht während der 5 bis 10 Entwicklungswoche durch die Verschmelzung der einzelnen Gesichtswülste ³⁰. Im Folgenden soll kurz auf die Entwicklung des Mittelgesichts eingegangen werden.

1.2.1 Die Entwicklung des Mittelgesichts

Die folgende Übersicht wurde mit Hilfe der Quellen 31 und 32 erstellt. Ein 3mm langer und 4 Wochen alter Embryo ist durch das Auftreten von Kiemenbögen gekennzeichnet, welche durch abgesiedelte Zellen der ektodermalen Neuralleiste in die zukünftigen Kopf und Nackenregion entstehen. Die Kiemenbogenpaare zeigen einen einheitlichen Aufbau aus einer Kiemenbogenarterie, einer Knorpelspange, einem Muskelement und einem Kiemenbognerven (Abbildung 2).

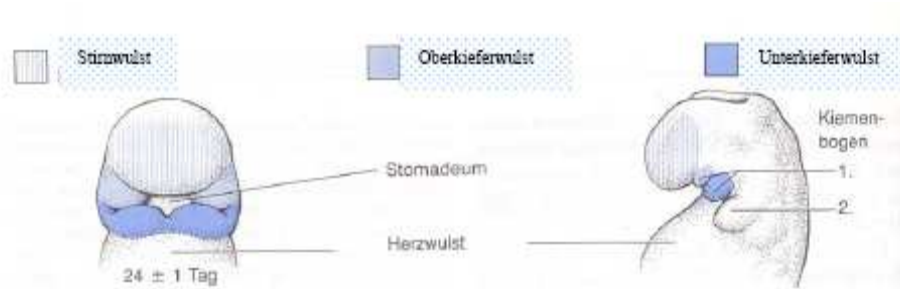


Abbildung 2: Entwicklung des Mittelgesichts durch die Verschmelzung der 5 Gesichtswülste am 24.Embryonaltag ³³.

Links: Der unpaare Stirn-Nasenwulst (schraffiert) und die paarigen Ober-(hellblau) und Unterkieferwülste (dunkelblau) umgeben die Mundbucht (Stomadeum). Rechts: Ober- und Unterkieferwülste differenzieren sich aus dem ersten Kiemenbogenpaar.

Für die Mittelgesichtsentwicklung spielt dabei das erste Kiemenbogenpaar eine besondere Rolle, da es die Anlagen für die Ober- und Unterkieferwülste trägt. Neben den beiden paarigen Ober- und Unterkieferwülsten ist auch der unpaare Stirnnasenwulst an der späteren Entwicklung des Mittelgesichts beteiligt. Die insgesamt fünf Gesichtswülste gruppieren sich in der vierten Entwicklungswoche um die primäre Mundhöhle (Mundbucht). Die Wülste sind durch epitheliale Einsenkungen des Oberflächenektoderms (Gesichtsfurchen) voneinander getrennt, in der Tiefe jedoch durch einen einheitlichen Bindegewebskörper miteinander verbunden. Zunächst bilden sich am Fuße des Stirn-Nasenwulst zwei ektodermale

Epithelverdickungen (Riechplakoden), die sich anschließend als sogenannte Riechgruben in die Tiefe absenken und die primäre Nasenanlage darstellen. Für die Ausgestaltung des Gesichts sind weiterhin drei Vorgänge von Bedeutung. Die Massenzunahme der mesenchymalen Gesichtswülste, das vollständige Verstreichen der Gesichtsfurchen und die Wanderung der seitlich angelegten Augen und damit die Annäherung der weit voneinander entfernten Nasenanlagen. Bis zum Ende der zehnten Entwicklungswoche sind alle fünf Gesichtswülste miteinander verschmolzen und die Gesichtsentwicklung gilt im Wesentlichen als abgeschlossen. Dabei wird die ehemalige Verschmelzungslinie als embryonale Fusionszone definiert.

1.2.2 Die Rolle der Embryonalentwicklung in der Pathogenese von Tumoren

Es gibt eine Reihe von Faktoren, welche in der Pathogenese von Tumoren eine Rolle spielen. Dabei scheint auch die Embryonalentwicklung des Menschen bedeutsam zu sein. Die aus der Organogenese hervorgehenden morphogenetischen Einheiten sind zwar makroskopisch schwer zu identifizieren, Tumore halten sich allerdings im Rahmen ihrer Ausbreitung weitgehend an die Grenzen dieser Kompartimente. Diese Hypothese wurde am Beispiel des Zervixkarzinom vom Leipziger Gynäkologen Prof. Dr. med Michael Höckel formuliert und wissenschaftlich untersucht. Eine morphogenetische Einheit beschreibt dabei einen topographisch definierten anatomischen Raum, dessen Elemente aus einem gemeinsamen embryonalen Vorläufergewebe hervorgegangen sind ³⁴. Das uterovaginale Kompartiment stellt einen solchen Raum dar, der sich im Zuge der weiblichen Genitalentwicklung aus dem Gewebe des ehemaligen Müllergangs gebildet hat ³⁴. Während sich der sogenannte Müllergang in der männlichen Embryonalentwicklung unter dem Einfluss der Geschlechtshormone zurückbildet, differenzieren sich daraus bei weiblichen Embryos die inneren Geschlechtsorgane so auch die Zervix, die proximale Vagina sowie das vaskuläre und ligamentöse Mesometrium ³⁴. Es konnte gezeigt werden, dass die makroskopische, mikroskopische und okkulte lokale Tumorausbreitung beim Zervixkarzinom relativ lange während der malignen Progression auf das uterovaginale Kompartiment beschränkt bleibt ³⁵. Auf dieser Erkenntnis beruhend wurde das derzeitige Standardvorgehen in der Therapie des Zervixkarzinom, die sogenannte abdominale radikale Hysterektomie, durch die 1998 vom Höckel entwickelte „Totale Mesometriale Resektion“ (TMMR) abgelöst. Trotz der vermeintlichen Radikalität des erst genannten „klassischen“ Verfahrens musste die Operationmethode beim histopathologischen Nachweis von Risikofaktoren mit einer adjuvanten Strahlentherapie kombiniert werden, um eine akzeptable lokale Tumorkontrolle zu

erzielen ³⁶. Die TMMR selbst beruht auf neuen Vorstellungen von der Anatomie des weiblichen Beckens, der lokalen Tumorausbreitung sowie einem neuen Prinzip für radikale Tumoroperationen. Dabei wird unter Berücksichtigung der uterovaginalen Kompartimentgrenzen bei völligem Verzicht auf Strahlentherapie eine sehr hohe lokoregionäre Rezidivfreiheit bei minimaler Morbidität erreicht ³⁶. Die eFZ im Mittelgesicht wurde bislang als Zone geringen mechanischen Widerstandes definiert ³⁷. Dieses spezielle Kompartiment könnte allerdings auch durch seine ontogenetische Herkunft durch spezifische Eigenschaften charakterisiert sein. Fraglich ist, ob die aus der Embryonalentwicklung hervorgegangene embryonale Fusionszone ebenfalls eine Art morphogenetische Einheit darstellt und so die Tumorausbreitung begünstigt.

1.2.3 Korrelation zwischen der anatomischen Verteilung von Basalzellkarzinomen und der embryonalen Fusionszone

Mehr als 80% aller BZK sind im Kopf-Halsbereich lokalisiert ¹¹. Vor allem im Mittelgesicht häuft sich diese Art von Hautkrebs. Doch gibt es dort wiederum Regionen, die besonders stark betroffen sind:

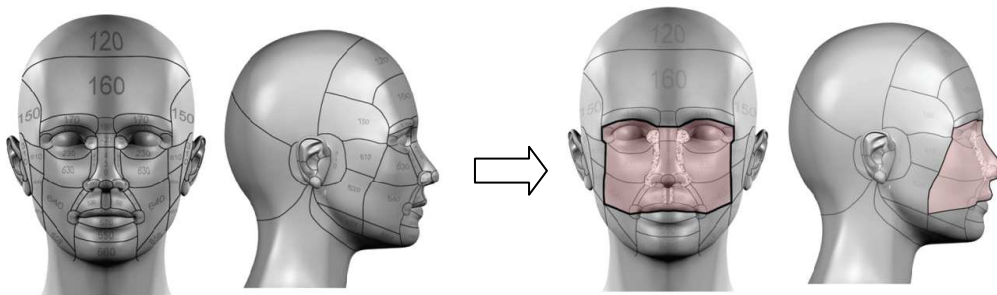


Abbildung 3: Die embryonale Fusionszone.

Links: Kompartimenteinteilung des Gesichts anhand der verwendeten Graphik ³⁸. Rechts: Die einzelnen Kompartimente des Mittelgesichts wurden schwarz umrahmt. Während der Bereich der eFZ grau markiert wurde, stellen sich die restlichen Kompartimente des Mittelgesichts rot dar ³⁹.

Ein Großteil der Tumore befindet sich nachweislich in einem Kompartiment, dass allein nur 11,3% der Gesamtfläche des Mittelgesichts einnimmt, in der embryonalen Fusionszone. Zu dieser Erkenntnis kamen Jessica Clark Newmann und David J. Leffell bei der Untersuchung von 1457 BZK-Patienten ³⁹. Anhand der in Abbildung 3 (linkes Bild) dargestellten Graphik konnten die BZK je nach Lokalisation einzelnen definierten und nummerierten Kompartimenten des Gesichtes zugeordnet werden. Die embryonale Fusionszone setzte sich

dabei (siehe Abbildung 3, rechtes Bild) aus folgenden vier Kompartimenten zusammen (von oben nach unten): *medial canthus* („mediale Lidspalte“), *paranasal area* („Paranasalregion“), *alar crease* („Nasenflügelanstieg“), *philtral ridge* („Philtralkamm“). Von den 859 Patienten, die ein BZK im Mittelgesicht aufwiesen, lagen 35% der Tumore in der verhältnismäßig kleinen embryonalen Fusionszone (siehe Abbildung 4). Daraus leiteten Newmann und Leffell ein fünf Mal häufigeres Auftreten von BZK innerhalb der embryonalen Fusionszone im Vergleich zu anderen Bereichen des Mittelgesichts ab.

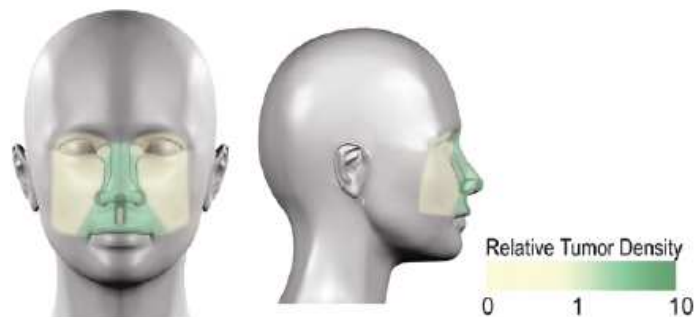


Abbildung 4: Verteilung von 859 BZK im Mittelgesicht ³⁹.

Die relative Tumordichte im Verhältnis zur Kompartimentgröße wurde mit Hilfe einer Farbskala dargestellt. Kompartimente mit einer hohen Tumordichte wurden dabei dunkelgrün markiert. Zonen mit geringerer Tumordichte erscheinen heller.

1.2.4 Korrelation zwischen dem Tiefenwachstum von Basalzellkarzinomen und der embryonalen Fusionszone

Doch treten BZK nicht nur gehäuft in der sogenannten embryonalen Fusionszone auf, sondern fallen dort auch durch vielfach invasivere Wachstumsformen im Vergleich zu anderen Regionen des Mittelgesichts auf ^{37, 40, 41, 42, 43}. Erstmalig registrierten Mohs und Lathrop 1952 ein verstärktes Tiefenwachstum von Epitheliomen innerhalb der embryonalen Fusionszone ⁴⁰. Im Jahr 1978 beschrieben Mora and Robins die besonders Gewebe penetrierende Form der Tumorausbreitung von im Bereich des Mittelgesichts lokalisierten BZK-Tumorzellen ⁴¹. Ein Jahr später, 1979, beschäftigten sich Panje und Ceilley ebenfalls mit dem Einfluss der embryonalen Fusionszone auf die Tumorprogression ⁴². Dabei zeigte sich, dass BZK innerhalb der eFZ über die Fähigkeit verfügen, bei der Überschreitung eigener Kompartimentgrenzen den Übergang von oberflächlichen Tumorwachstum in vertikale Proliferationsphasen zu induzieren. Im gleichen Jahr verwiesen auch Levine and Bailin auf die Tatsache, dass sich BZK in diesem speziellen Kompartiment merklich früher als andere Tumore in die Tiefe absiedeln würden ⁴³. Aufbauend auf diesen Erkenntnisse verglich

Granström *et al.* 1986 die Rezidivraten von BZK innerhalb und außerhalb der eFZ³⁷. Dabei zeigten sich deutlich höhere Rückfallraten innerhalb der eFZ als in anderen vergleichbaren Zonen des Mittelgesichts. Infolgedessen wurde die eFZ als Risikogebiet einer erleichterten Tumorausbreitung definiert.

1.3 Interaktion von Tumor- und Stromazellen im Rahmen der Tumorprogression

1.3.1 Die Aktivierung von Stromafibroblasten in Tumoren

Die Ausbreitung eines Tumors über Kompartimentgrenzen hinweg wird vor allem durch das Zusammenspiel von Tumor und Stromazellen ermöglicht. Am malignen Melanom wurde der Einfluss von Tumor-Stroma Interaktionen ausführlich untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich tumorzellaktivierte Fibroblasten (FB) im peritumoralen Stroma von Melanomen befinden⁴⁴. Über die Synthese von löslichen Mediatoren sind Melanomzellen in der Lage die umliegenden FB zu aktivieren und ihre Genexpression zu modifizieren^{45, 46}. Eigene Vorarbeiten (Forschungsgruppe) legen nahe, dass tumorzellstimulierte FB durch eine auf diesem Wege gesteigerte Hyaluronsäure (HA)-Synthese die Melanomprogression fördern (siehe 1.3.2. und 1.3.3). In mehreren Studien wurde die Wirkung verschiedener Mediatoren auf die HA-Synthesekapazität von Mesenchymzellen untersucht. *Platelet-derived growth factor* (PDGF-BB) sowie *Transforming growth factor-β* (TGF-β) wurden dabei als wesentliche Stimulatoren der HA-Synthese beschrieben^{47, 48, 49}. Vor allem bei Synovialzellen konnte durch TGF-β eine gesteigerte Hyaluronsäure Synthetase (HAS)1 Induktion erzielt werden⁴⁷. Dennoch gilt seine Wirkung auf HA-Synthetasen dermalen FB weiterhin als umstritten⁵⁰. Eine Analyse der HAS- sowie der Hyaluronidase (HYAL)-mRNA Expression zeigte, dass nach einer Stimulation mit PDGF-BB die basale HAS2 mRNA Expression verdreifacht werden konnte⁵⁰. Ferner wurde ein bislang unbekanntes Gen MEL4B3 aus FB isoliert, die zuvor mit Melanomzellüberständen oder direkt durch lösliche Mediatoren von Melanomzellen wie TGF-β₁ und Interleukin-1β (IL-1β) stimuliert wurden⁴⁵. Infolge der Tumorstimulation werden FB nicht nur rekrutiert und zur Proliferation angeregt sondern auch in Myofibroblasten umgewandelt⁵¹. Neben HA wird die Expression von Proteasen⁴⁴ und anderen Genprodukten⁴⁵ wie z.B. Wachstumsfaktoren, die voraussichtlich für Tumorproliferation und Migration verantwortlich sind, in den FB induziert. Vor allem die durch den Wachstumsfaktor *basal fibroblast growth factor* (bFGF) exprimierten Matrixmetalloproteinasen wie MMP-1 wurden in steigenden Konzentrationen im

umliegendem Stroma von Melanomzellen detektiert^{44, 52}. Es konnte nachgewiesen werden, dass Tumorzellinvasion ohne das Vorhandensein von FB *in vitro* nicht möglich ist⁵². Diese Daten verdeutlichen die essentielle Rolle der FB für die Tumordinvasion.

1.3.2 Das Polymer Hyaluronsäure

Das Glykosaminoglykan HA ist ein lineares Polysaccharid, das aus alternierenden Einheiten von Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin besteht. Trotz des offensichtlich simplen Aufbaus ist dieses hochmolekulare Polymer (MW > 100 kDa) durch vielfältige Eigenschaften gekennzeichnet. So gilt HA neben weiteren wichtigen Funktionen als Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Entgegen anderen Glykosaminoglykanen wird es an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran gebildet und als wachsende Dissacharid-Kette ins Plasma abgegeben⁵³. Nach derzeitigen Erkenntnissen sind drei aufbauende⁵⁴ und drei abbauende Enzyme⁵⁵ bekannt. Von HA-Synthetasen exprimierte HA-Ketten können durch unterschiedliche Molekülgrößen charakterisiert sein. Ein Polymer besteht typischerweise aus $n > 10^3$ Dissacharideinheiten und weist eine Molekülmasse von ~1-10 MDa auf. HA-Moleküle binden entsprechend ihrer Größe an spezifische extrazelluläre oder oberflächliche HA-Rezeptoren und nehmen folglich verschiedene Funktionen im Zellstoffwechsel wahr. Hochmolekulare HA-Moleküle vernetzen sich in der extrazellulären Matrix mit HA-Rezeptoren zu makromolekularen Aggregaten und sind so zum Beispiel an der Regulation der Zelladhäsion, Zellbeweglichkeit, Zellwachstum sowie Zelldifferenzierung beteiligt. HA-Oligosaccharide dagegen verfügen über die Fähigkeit durch Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren Einfluss auf intrazelluläre Signalwege zu nehmen⁵⁶. Der ubiquitäre Oberflächenrezeptor CD44 ist einer der wichtigsten Rezeptoren für HA und gilt als essentiell für Zell-Zell oder Zell-Matrix Interaktionen. Durch die Bindung von HA werden verschiedene Signalkaskaden, die für inflammatorische Prozesse und Tumorprogression von Bedeutung sind, getriggert⁵⁷. Spezifische Interaktionen von HA mit anderen Makromolekülen des Extrazellularraums wie mit den Proteoglykanen Aggrecan und Versican gelten als essentiell für die Strukturgebung verschiedener Gewebe⁵⁸.

Auch während der Embryonalentwicklung spielt HA eine bedeutende Rolle. Während der Entwicklungsphase eines Embryos gelten ausreichend hohe HA-Konzentrationen in der extrazellulären Matrix als Voraussetzung jeglicher Formen von Zellwachstum und Zelldifferenzierung. So sind embryonale Stammzellen in Abwesenheit von HA unfähig zur Gewebeinvasion und Zellproliferation, zwei absolut wesentlichen Prozessen im Hinblick auf

Gewebe- und Organentwicklung⁵⁹. HA-reiche Matrices erleichtern über die Bildung einer hydrierten Mikroumgebung Zellmigrationsprozesse, so dass etwaige Zellbarrieren einfacher überwunden werden können⁵⁸. Zum Anderem wird die Zellabrundung und Zellablösung während der Mitose in entsprechend hydrierten Matrices unterstützt⁵⁸. Außerdem konnte gezeigt werden, dass HAS2 knockout Mäuse innerhalb der ersten 9-10 Tage ihrer embryonalen Entwicklung aufgrund ungenügender HA-Synthese versterben⁵⁹. Zu geringe HA-Konzentrationen in dieser sensiblen Periode gehen z.B. mit kardialen Fehldifferenzierungen einher⁵⁹. Auslöser dafür ist vor allem die gestörte HA-induzierte Transition von endothelialen Vorläufern zu mesenchymalen Zellen⁵⁹. Vergleichbare Transitionsprozesse sind ebenfalls für die Entwicklung weiterer Gewebe oder Organe verantwortlich. Dazu zählen u.a. die Entwicklung der Neuralleiste, des Muskel bzw. Skelettsystems, sowie des peripheren Nervensystems⁶⁰. Auch im Zuge der Tumorausbreitung und Metastasierung spielen HA-getriggerte Zelltransitionen eine bedeutende Rolle⁶¹

1.3.3 Die Tumor-stimulierende Wirkung von Hyaluronsäure

Hyaluronsäure, die im Rahmen der Tumorprogression im Tumorstroma akkumuliert, gilt als wesentliches Produkt von tumorzellregulierten FB. Auch Tumorzellen selbst sind in der Lage HA zu bilden. Bei MM Zellen ist die HA-Syntheseleistung *in vitro* allerdings um das 1000fache niedriger als die von FB. Ein gehäuftes Auftreten von HA im peritumoralen Stroma ist bei einer Vielzahl von Tumoren beschrieben⁶²⁻⁶⁵. *In vitro* gehen eine vermehrte Ablagerung oder erhöhte Serumkonzentrationen von HA in der Tumorumgebung oft mit einer schlechten Tumordifferenzierung und einem verstärkt invasiven Verhalten von Tumorzellen einher⁶⁶. So weisen HA-Akkumulationen im peritumoralen Stroma beim malignen Melanom auf eine verstärkte Tumorproliferation hin und sind mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet⁶⁷. Ebenso zeigen Brust-, Kolon- und Ovarialkarzinom bei erhöhten HA-Werten ungünstige Verläufe^{62, 63, 65}. Dabei steigt die Serumkonzentration von freier HA im Laufe der Tumorprogression erheblich⁶⁸.

HA-Zell-Interaktion sind wesentlich an der Regulation der Tumorproliferation beteiligt^{69, 70}. Jüngst wurde die Tumor-stimulierende Wirkung von HA in einer experimentellen Studie demonstriert. So regte extern zugegebene HA die Proliferation von Melanomzellen an⁷¹. Weiterhin migrierten Melanomzellen *in vitro* auf HA-beschichteten Trägern wesentlich besser als auf anderen Matrices⁷². Von besonderer Bedeutung für die Tumorprogression ist die Interaktionen von HA mit dem Transmembranrezeptor CD44, über den Signale für Tumorproliferation, Migration und Apoptose vermittelt werden^{67, 71, 73}. Es konnte belegt

werden, dass der physiologisch-relevante HA-Rezeptor CD44 auf Tumorzellen verstärkt exprimiert wird ⁶⁷. An Mesotheliomzellen konnte gezeigt werden, dass die Bindung von HA an CD44 die Tumorausbreitung in angrenzende Gewebsschichten begünstigt ⁷⁴. In einer weiteren Studie wurde die Wirkung einer HAS2 bzw. HYAL1-Überexpression auf die Tumorprogression untersucht ⁷⁵. Dabei wurde deutlich, dass erhöhte HAS2- sowie verminderte HYAL1- Level das Tumorwachstum fördern ⁷⁵. Es konnte nachgewiesen werden, dass aggressive Mammakarzinomzellen große Mengen an HA produzieren und CD44 exprimieren ⁷⁶. Demgegenüber zeigten nichtinvasive Mammakarzinomzellen geringere Mengen an synthetisierter HA sowie exprimierten CD44 ⁷⁶. Experimentelle Ansätze zur Blockierung von Zell-HA-Interaktionen inhibieren Tumorwachstumsprozesse und induzieren den Weg in die Apoptose ⁷⁷. Exemplarisch führten Manipulationen der HA-Interaktionen unter entsprechender Zuhilfenahme von Antikörpern gegen z.B. CD44, RHAMM (weiterer HA-Rezeptor) und HA-Oligomere zur erfolgreichen Inhibition von Tumorwachstum und Metastasierung im Tiermodell ^{78, 79, 80}.

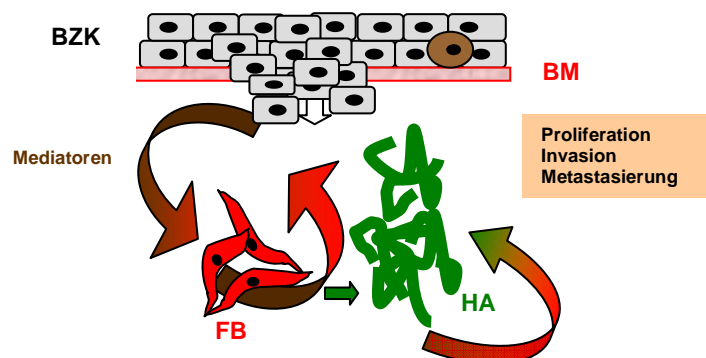


Abbildung 5: Hypothese zu den Mechanismen der Induktion der HA-Synthese im Stroma von Basalzellkarzinomen.

Lösliche Mediatoren von Tumorzellen induzieren die HA-Synthese durch umliegende FB. Die gebildete HA unterstützt das Tiefenwachstum der BZK-Zellen.

Legende: BZK = Basalzellkarzinom, BM = Basalmembran, FB = Fibroblasten, HA = Hyaluronsäure.

Gerade für den Übergang von Tumorzellen in vertikale Wachstumsphasen scheint HA eine essentielle Rolle zu spielen. Mit Hilfe der genannten Vorgänge ist es Tumorzellen höchstwahrscheinlich möglich ein verstärkt invasives Tumorwachstum zu begünstigen. Ähnliche Mechanismen lassen sich beim BZK vermuten, welches gerade durch massives Tiefenwachstum im Bereich der embryonalen Fusionszone schwer beherrschbar ist. So ist fraglich ob die verstärkte Invasivität in diesen speziellen Zonen durch Änderungen im HA-Stoffwechsel zu erklären sind. Wie in Abbildung 5 ersichtlich wird diskutiert, ob

Basalzellkarzinome über lösliche Mediatoren die umliegenden Stromafibroblasten aktivieren und damit zur verstärkten HA-Synthese anregen.

1.4 Fragestellung

Die Anwesenheit von HA gilt als Voraussetzung für Zellproliferation und Zellmigration sowohl in der Embryonalentwicklung als auch bei sämtlichen Tumorentitäten. *In vitro* gehen eine vermehrte Ablagerung oder erhöhte Serumkonzentration von HA in der Tumorumgebung oft mit verstärkt invasivem Verhalten von Tumorzellen einher⁶⁶. So scheint HA gerade für den Übergang von Tumorzellen in vertikale Wachstumsphasen eine essentielle Rolle zu spielen. Da Basalzellkarzinome bevorzugt innerhalb der embryonalen Fusionszone, aber kaum in anderen Lokalisationen invasiv in die Tiefe wachsen, sollen von diesen Tumoren die tumorumliegenden Bindegewebskompartimente hinsichtlich ihres HA-Stoffwechsels untersucht werden. Dabei wurden in expandierten Primärkulturen der HA-Gehalt, die gebildete HA-Polymergröße und die exprimierten Enzyme des HA-Stoffwechsels in Abhängigkeit von ihrer Lokalisationen miteinander verglichen. Die folgenden Fragen sollen im Zuge dieser Untersuchung beantwortet werden:

- Unterscheiden sich tumornahe (TM) und tumorferne (RF) FB generell hinsichtlich ihres HA-Stoffwechsels?
- Sind FB aus der embryonalen Fusionszone durch eine erhöhte Synthesekapazität für HA charakterisiert?
- Gibt es Unterschiede hinsichtlich der Größe der HA-Moleküle, die *in vitro* von FB aus den zu vergleichenden Lokalisationen „innerhalb (eFZ)“ und „außerhalb (aeFZ) der embryonalen Fusionszone“ gebildet werden?
- Unterscheiden sich FB aus der embryonalen Fusionszone und anderen Regionen des Gesichtes hinsichtlich ihrer Ansprechrate auf Mediatoren wie TGF- β_1 oder PDGF-BB bei der Induktion der HA-Synthese?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

8-Kanal-Pipette	Eppendorf AG , Hamburg, D
Autoklav 23	Melag oHG Medizintechnik, Berlin, D
Blot Absorbent Filter Paper	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Brutschrank HERAcell [®] 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Centrifuge 5403 (Kühlzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Centrifuge 5417R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Chirurgischer Einmal-Skalpell	Aesculap AG, Tuttingen, D
Chronos Biosafe [®] Stickstofftank	Messer Group GmbH, Sulzbach, D
Countness [™] cell counter	Invitrogen, Oregon, USA
Countness [™] cell counting chamber slides	Invitrogen, Oregon, USA
Cryo-Star HM 560 M	Microm International GmbH, Walldorf, D
Deckgläschen	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH und Co. KG, Braunschweig, D
Einmalinjektionskanüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Einmalküvette aus Polystyrol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, D
Elektrophorese Kammer	Angewandte Gentechnologische Systeme GmbH, Heidelberg, D
Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech, Uppsala, S
Chemilumineszenz- Imaging System INTAS	INTAS Science International GmbH, Göttingen, D
Gasbrenner Gasprofi 1	WLD-TEC GmbH, Göttingen, D
Gefrierschrank -20 ° C	Privileg Quelle GmbH, Fürth, D
Gefrierschrank HERAfreeze [®] -80 ° C	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Gewebekulturflaschen (12,5 cm ²)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Gewebekulturflaschen (25 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Feuchte Kammer	Tupperware [®]

Küvetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
Lichtmikroskop CKX41	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Lichtmikroskop Olympus BX41	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Mastercycler [®] gradient (Thermocycler)	Eppendorf AG, Hamburg, D
MC1 Laboratory LC 2200 S (Waage)	Sartorius AG, Göttingen, D
Metallblock	Microm International GmbH, Walldorf, D
Microprocessor pH-Meter pH 211	Hanna Instruments GmbH, Kehl am Rhein, D
Mikrowelle Siemens HF12M240	Siemens AG, München, D
Minigel-Elektrophoresekammer MINI SUB DNA CELL	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Mini-PROTEAN [®] 3 Electrophoresis Module	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Mini Rocking Platform	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, D
MR 3002 Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, D
ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Objektträger SuperFrost [®] Plus D	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH und Co. KG, Braunschweig, D
Optitran Nitrocellulose Membran Parafilm [®] M	Whatman GmbH, Dassel, D Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR-Tubes (0,2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Peha-soft Powderfree Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim, D
Pinzette	
Pipetten mit Spitze (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
PP-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Profi Line Kühlschrank	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, D
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Rotamax 120 Schüttelgerät	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, D
Rotor-Gene [™] 3000	Corbett Research, Sydney, AUS
Sterilbank	Clean Air Engineering Inc., Palatine, USA
Stromversorgungsgerät PS 500 XT DC	Hoefler Scientific Instruments, San Francisco,

POWER SUPPLY	USA
Synergy TM HT ELISA-Reader	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, D
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, D
Vacupack plus Folienschweißgerät	Krupps GmbH, Offenbach am Main, D
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, D
Vortex Genie 2 TM	Bender und Hobein AG, Zürich, CH
Wasserbad	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Zellkulturschalen (150 mm x 20 mm)	TPP - Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Zellsieb 70µm Nylon, BD Falcon	BD Biosciences, Bedford, USA

2.1.2 Chemikalien und Medien

Aceton	Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, USA
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Aquatex [®]	Merck KGaA, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
BSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Cetylpyridinium chloride monohydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Collagenase from Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dispase [®] II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
DMSO Uvasol [®]	Merck KGaA, Darmstadt, D
DEPC	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, D
Dulbecco's PBS 1 x	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Dulbecco's MEM	Biochrom AG, Berlin, D
EDTA	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ethanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
FKS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Glycin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D

Glykogen (aus Austern)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Glyzerin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Hämalaun	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Isopropanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Methanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Mycokill	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd	E. Merck, Darmstadt, D
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Tissue-Freezing Medium (Einbettmedium)	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D
Tris	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Trypsin/EDTA Solution 0,05 %/0,02 %	Biochrom AG, Berlin, D
Tween 20	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Xylencyanol	

2.1.3 Lösungen und Puffer

➤ 2,5 M Kaliumacetat zum Fällen von RNA

2,45 g Kaliumacetat in 10 ml DEPC- H_2O lösen, mit konzentrierter Essigsäure einen pH-Wert von 5,0 einstellen, steril filtrieren, aliquotieren und bei -20°C einfrieren.

➤ **Glykogen zum Fälen von RNA**

10 mg Glykogen aus Austern in 10 ml DEPC-H₂O lösen, steril filtrieren, aliquotieren und bei -20 ° C einfrieren.

Die aufgeführten Lösungen und Puffer wurden mit RNase-freiem, bidestilliertem Wasser angesetzt:

DEPC-H₂O: 1 ml DEPC in 999 ml H₂O lösen, autoklavieren und bei 4 ° C lagern.

➤ **Dispase II für Isolierung von Fibroblasten**

für 10x Lösung Pulver in 50 ml PBS lösen (22 U/ml), einfrieren bei -20° C, einen Teil der 10 x Lösung 1:10 mit PBS verdünnen (Gebrauchslösung = 2,2 U/ml).

➤ **Kollagenase für Isolierung von Fibroblasten**

für 20ml 1xLösung Pulver in 20 ml HBSS lösen + 40µl 1 M CaCl₂.

➤ **Kultivierungsmedium für Fibroblasten**

DMEM	
FKS	10 %
Penicillin/Streptomycin	1%
Mycokill AB	10 ml

➤ **10 x PBS**

NaCl	1,38 M
KCl	27 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	80 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM
	pH 7,1 (NaOH)
Gebrauchslösung (1 x)	10 % 10 x PBS
	90 % H ₂ O

➤ **Blocking-Puffer für HA-Western**

Natriumacetat	100 mM
MgCl	1 M
Tween 20	0,05 %
Magermilchpulver	2%

Gebrauchslösung	pH= 6,0
-----------------	---------

➤ **1x TAE-Puffer für HA-Western**

Tris	40 mM
Natriumacetat	5 mM
Na-EDTA	0,8 mM
Gebrauchslösung	pH 7,9

➤ **Sörensen-Phosphatpuffer 0,1M (SPP) für HA-Färbung**

Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	0,2 M
NaH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O	0,2 M
Gebrauchslösung	pH=7,4, mit H ₂ O verdünnen bis 0,1M

➤ **Formiatpuffer zum Hyaluronidaseverdau**

Ameisensäure	0,1 M
Natriumformiat	0,1 M
Gebrauchslösung	Mit NaOH auf pH=3,7 einstellen

2.1.4 Primer

Alle verwendeten Primer (Tabelle 2) wurden mit Hilfe der HUSAR Software (EMBL, Heidelberg, D) kreiert und von *Metabion International AG* (Martinsried, D) bezogen. Die entsprechenden Plasmide wurden durch Klonierung der PCR-Produkte in *pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy* Vektoren (Promega Corporation, Madison, USA) hergestellt und nachfolgend als Mengenstandards für die quantitative realtime PCR genutzt.

Tabelle 2: Primer für die quantitative *Real-time* PCR

Name	Accession Number	Sequenz	Annealing Temperatur
RPS26	NM_001029	<i>forward:</i> 5'-GCA GCA GTC AGG GAC ATT TCT G-3' <i>reverse:</i> 5'-TTC ACA-TAC AGC TTG GGA GCC A-3'	61° C
HAS1	NM_001523	<i>forward:</i> 5'-AGT ACA CCT CCA GGT CCC G-3' <i>reverse:</i> 5'-GCA GAG GGA CGT AGT TAG CG-3'	62° C
HAS2	NM_005328	<i>forward:</i> 5'-AGA GCA CTG GGA CGA AGT G-3' <i>reverse:</i> 5'-ATG CAC TGA ACA CAC CCA AA-3'	58° C
HAS3	NM_005329	<i>forward:</i> 5'-AGC TGG TGG GAT CAA G-3' <i>reverse:</i> 5'-AGG CCA ATG ACA CCA C-3'	58° C
HYAL1	NM_007312	<i>forward:</i> 5'-CAG AGC CGT GCC CTC TAT-3' <i>reverse:</i> 5'-TCA TCC AGG GGC AGA AAG T-3'	60° C
HYAL2	NM_003773	<i>forward:</i> 5'-CTC ACG GGG CTT AGT GAG AT-3' <i>reverse:</i> 5'-CCC AGG ACA CAT TGA CCA C-3	60° C
HYAL3	AF_502912	<i>forward:</i> 5'-CCT CCA GTC CCC TCT TCC-3' <i>reverse:</i> 5'-ACA AGG TCA TCC TGG GAC AG-3'	60° C

2.1.5 Immunreagenzien

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Immunreagenzien verwendet:

Tabelle 3: Verwendete Immunreagenzien

Immunreagenz	Verdünnung für Immunodetektion	Bezugsquelle
<ul style="list-style-type: none"> HA-BP (Hyaluronsäure-Bindungsprotein) Seikagaku, USA 	1:167 für HA-Färbung 1:200 Western-Blot	Ams Biotechnology Ltd., Abingdon, UK
<ul style="list-style-type: none"> Streptavidin-POD (α-biotin-POD) 	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

2.1.6 Sonstige Materialien, Reagenzien und Kits

10 x GenTherm™ buffer without MgCl ₂	Rapidozym GmbH, Berlin, D
100-bp-Leiter	Life Technologies, Carlsbad, USA
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
dNTPs (je 100 mM)	Bioline GmbH, Luckenwalde, D
ECL Western Blotting Substrate	Pierce, Perbio Science GmbH, Bonn, D
GenTherm™ DNA-Polymerase	Rapidozym GmbH, Berlin, D
Healon Hyaluronsäure Spritze a 10mg	Pharmacia & Upjohn
Hyaluronic acid Quantitative Test kit	Corgenix, Broomfield, USA
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
innuPREP® RNA Mini Kit	Analytikjena AG, Jena, D
MgCl ₂ 50 mM	Rapidozym GmbH, Berlin, D
M-MLV Reverse Transkriptase 200 U/μl	Promega GmbH, Madison, USA
M-MLV RT 5 x Buffer	Promega GmbH, Mannheim, D
New Fuchsin Substrate System	Dako Dänemark A/S, Glostrup, Dänemark
Oligo(dt) ₁₅ Primer 500 μg/ml	Promega GmbH, Mannheim, D
PCR Pipettierautomat 2009	Qiagen GmbH, Hilden, D
PDGF-BB	PeptoTech GmbH, Hamburg, D
Buffer	Pierce, Perbio Science GmbH, Bonn, D
rRNAsin RNAase-Inhibitor 40 U/μl	Promega GmbH, Mannheim, D

Super Sensitive™ Link-Label IHC Detection System RTU MultiLink®	BioGenex Laboratories, Hamburg, D
Alkalische Phosphatase/Fast Red SYBR® Green	BioGenex Laboratories, San Ramon, USA Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
TGF-β1	Strathmann Biotec-GmbH, Hamburg, D
Trockeneis	

2.1.7 Patientenproben

BZK aus der eFZ und aus anderen Bereichen des Mittelgesichts wurden von in der Universitätsklinik Leipzig operierten Patienten nach deren Einwilligung gemäß positivem Votum der Ethikkommission zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurde Tumorgewebe von 28 Patienten untersucht. Darunter befanden sich 12 männliche und 16 weibliche Patienten/innen. Tumore außerhalb der eFZ waren hauptsächlich an der Schläfe, Stirn, Augenbraue, Oberlippe und auf der Wange lokalisiert. Die Hautstücke hatten durchschnittlich eine Größe von 3×4mm. Für die Untersuchungen wurden primäre Normalfibroblasten, die aus BZK und gesunder Haut isoliert wurden, verwendet. Als Referenzprobe diente tumorfreies Gewebe des gleichen Patienten, welches im Zuge des plastisch rekonstruktiven Defektverschlusses von anfallenden Hautlappen entnommen wurde. Das Alter des untersuchten Patientengut lag mit 73 ± 11 Jahren (Mittelwert \pm Standardabweichung, Bereich 45-91 Jahre) im Bereich des BZK-Altersgipfels, der zwischen dem 60igsten und 80igsten Lebensjahrzehnt angegeben wird.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt, alle verwendeten Geräte wurden autoklaviert und sterilisiert. Die einzelnen Arbeitsschritte der Zellkulturuntersuchungen wurden wie in Abbildung 6 dargestellt, ausgeführt.

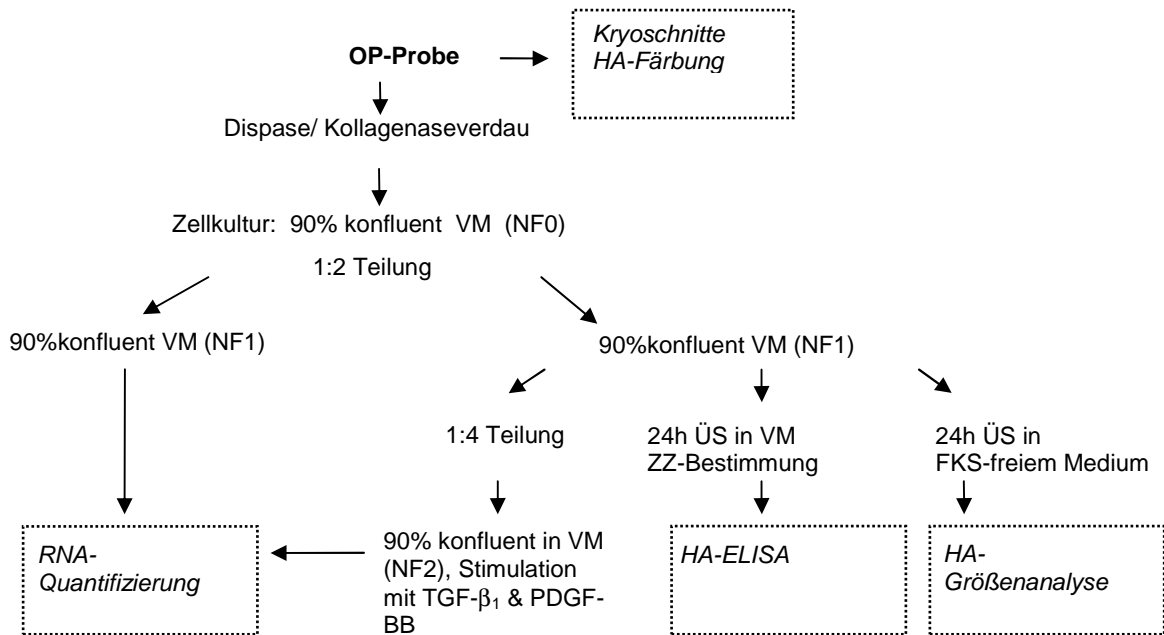


Abbildung 6: Übersicht des angewendeten experimentellen Ablaufs

2.2.1.1 Isolierung der Fibroblasten

Die extrazelluläre Matrix in tierischen Geweben ist eine komplexe Mischung aus Kollagenen und anderen extrazellulären Matrixproteinen (z.B. Glykoproteine oder Glucosaminoglykane). Für die Isolierung einzelner Zellen muss die Matrix schonend aufgelöst werden, wobei zelluläre Strukturen nicht beschädigt werden dürfen. Dispase sowie Kollagenase werden für die Isolierung von Zellen aus vielen Geweben eingesetzt.

➤ Dispaseverdau

Um die Hautprobe von Blutresten zu säubern, wurde sie zunächst unter sterilen Bedingungen zweimal mit 1×PBS gewaschen. Anschließend wurde sie in eine Bakterienkulturschale überführt. Dort wurde mittels Pinzette und Skalpell das Fettgewebe von der Haut-Probe entfernt und das Gewebe in zirka 2 mm große Stücke zerschnitten. Die einzelnen Haustücke wurden anschließend in ein Falconröhrchen mit zirka 2 ml Dispase (je nach Größe der Hautprobe variabel) gegeben und über Nacht im Kühlschrank bei 4° C inkubiert. Die Protease Dispase löst die Epidermis von der Dermis ab und macht so die FB für den folgenden Isolierungsschritt zugänglich.

➤ **Kollagenaseverdau**

Am zweiten Tag konnte die Epidermis mit Hilfe zweier Pinzetten von den einzelnen Hautstückchen abgezapft werden. Das Gewebe wurde in ein Falconröhrchen mit 200 µl Kollagenase (je nach Größe der Hautprobe variabel) überführt, geschüttelt und im Brutschrank bei 37° C für 30 min inkubiert. Das proteolytische Enzym Kollagenase löst den Zellverband auf, indem strukturgebende extrazelluläre Matrixbausteine gespalten werden. Anschließend wurde nochmals geschüttelt bis die Suspension trüb erschien. Die Aktivität der Kollagenase ließ sich mit der Zugabe von 3-5 ml Fibroblastenmedium abstoppen. Die Suspension wurde daraufhin durch einen 70 µm Filter in ein 50 ml Falconröhrchen filtriert und noch zwei Mal mit 5 ml Medium nachgespült. Anschließend wurde bei 453 ×g 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 4 ml Fibroblastenmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit 12,5 cm² großer Bodenfläche überführt. Die Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator unter 5% CO₂-Begasung und wassergesättigter Atmosphäre bei 37° C kultiviert.

2.2.1.2 Kultivierung der Zellen für RT-qPCR

Die Kultivierung der FB erfolgte in Dulbecco's MEM, welches mit 10% FKS versetzt wurde. Alle zwei Tage wurde das Kulturmedium gewechselt und täglich die Zellkulturflaschen unter dem Mikroskop inspiziert. Die Zelldichte wurde dabei stets mit dem Auge abgeschätzt. Bei 90% Konfluenz der FB der Passage 0 (NF0) wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 geteilt und in neue Kulturflaschen umgesetzt. Dazu wurde das verbrauchte Kulturmedium abgenommen und der Zellrasen zweimal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde mit FKS-haltigem Medium abgestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde mit PBS verdünnt und bei Raumtemperatur für 5 min bei 200 ×g zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in frisches Kompletmedium resuspendiert und auf zwei neue Zellkulturflaschen verteilt. Die FB der Passage 1 (NF1) wurden bei 90% Konfluenz zum einen für die RNA-Präparation lysiert (siehe 2.2.2.1), zum anderen, für den Stimulationsversuch mit TGF-β₁ und PDGF-BB, 1:4 geteilt (siehe 2.2.1.3).

2.2.1.3 Stimulation mit TGF-β₁ und PDGF-BB

TGF-β₁ und PDGF-BB gelten als bekannte Stimulatoren der HA-Synthese (siehe 1.3.1). Bei einer Zelldichte der FB von 90% sollte der Einfluss von TGF-β₁ und PDGF-BB auf die HA-Syntheseleistung untersucht werden. Dazu wurde bei allen vier Kulturflaschen (NF2) das verbrauchte Kulturmedium durch 3 ml Kompletmedium ersetzt. Anschließend wurde das

Medium der ersten Flasche mit 10 ng/ml TGF- β_1 , das der Zweiten mit 10 ng/ml PDGF-BB angereichert. Die letzten beiden Kulturflaschen blieben unstimuliert und galten als Negativkontrolle. Nach dreistündiger Inkubation wurden die FB für die RNA-Präparation lysiert (siehe 2.2.2.1).

2.2.1.4 Sammeln von Kultivierungsmedium für HA-ELISA

Fibroblasten gelten als Hauptproduzenten von HA, welche nach ihrer Bildung *in vitro* in das umliegende Medium abgegeben wird. 90% konfluente FB der ersten Generation (NF1) wurden zunächst mit PBS gespült und mit 3 ml Kompletmedium versehen. Das Kultivierungsmedium wurde nach 24 h abgenommen, bei ca. 200 \times g kurz zentrifugiert und in 2 ml Aliquots portioniert und gesammelt. Anschließend konnten die Proben für den späteren HA-ELISA bei -80° C eingefroren werden. Der Zellrasen wurde mit 1 ml Trypsin/ EDTA-Gemisch abgelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde mit FKS-haltigem Medium abgestoppt und nachfolgend mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in einem definierten Volumen PBS resuspendiert. Anschließend konnten in 20 μ l Zellsuspension nach Zugabe von 20 μ l Trypanblau (Verhältnis 1:1) die Zellzahl bestimmt werden. Diese wurde später für die Normalisierung der Ergebnisse des HA-ELISA (siehe 2.2.3.2) berücksichtigt.

2.2.1.5 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte automatisch mit dem Zellzählgerät CountessTM (Invitrogen) in einer Zellzählkammer. Zuvor wurden die toten Zellen mit Trypanblaulösung angefärbt.

2.2.1.6 Sammeln von Kultivierungsmedium für Agarose-Gelelektrophorese

90% konfluente FB der ersten Generation (NF1) wurden zunächst mit PBS gespült und mit 3 ml FKS-freiem Medium versehen. Das Kultivierungsmedium wurde nach 24 h abgenommen, bei ca. 200 \times g kurz zentrifugiert und in 2 ml Aliquots gesammelt. Anschließend konnten die Proben für die spätere Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.2.4) mit anschließendem Westernblot (siehe 2.2.3.1) bei -80° C eingefroren werden.

2.2.1.7 Einbetten von Hautproben

Um Kryoschnitte von den Hautproben anfertigen zu können, wurden die Gewebestücke zunächst geteilt und vom Fettgewebe getrennt. Danach wurden sie 24 h in 4%igem PFA fixiert und 24 h in 30%iger Succrose entwässert. Anschließend wurden sie auf Trockeneis unter Zuhilfenahme eines Metallblockes in *Tissue Freezing Medium* eingebettet und langsam eingefroren. Bis zum Schneiden der Proben (siehe 2.2.1.8) lagerten sie bei -80° C.

2.2.1.8 Anfertigen von Kryoschnitten

Unter Zuhilfenahme des KryoCut (*Cryostar HM 560 M*, Microm International GmbH) wurden Schnitte mit einer Dicke von 6 µm von Tumorproben und Referenzproben sowohl innerhalb als auch außerhalb der embryonalen Fusionszone angefertigt. Eine HA-Färbung sollte nun das Verteilungsmuster von HA in verschiedenen Zonen des Mittelgesichtes sichtbar machen. (siehe 2.2.4.1.)

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Präparation

Die adhärenenten FB wurden zunächst zweimal mit PBS gespült und mit *Lysis Solution RL* (Bestandteil des RNA-Präparations-Kit) lysiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des *innuPREP[®] RNA Mini Kits (Analytik Jena)*. Im letzten Schritt wurde die isolierte RNA in 30 µl RNAase-freiem Wasser eluiert. Mit dem Spektrophotometer ND-1000 konnte anschließend die Quantität der erhaltenen Gesamt-RNA gemessen werden. Lag die RNA-Konzentration unter einem Wert von 80 ng/µl wurde die RNA gefällt. Dabei wurde die gelöste RNA mit je 1 µl Glycogen, 3 µl 2,5 M Kaliumacetat und 800 µl eiskaltem 100%igem Ethanol versetzt und bei 4° C und 20800 ×g für 25 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die gefällte RNA mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals 10 min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet in 13 µl RNAase-freiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration erneut spektrophotometrisch gemessen. Die gelöste RNA wurde stets bei -80° C gelagert

2.2.2.2 Reverse Transkription

Während der cDNA-Synthese wird mRNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Als Primer diente ein Oligo(dt)-Nukleotid, welches an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet. Die Zusammensetzung eines 20 µl-Ansatz für eine cDNA-Synthesereaktion ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: 20 µl Ansatz für cDNA-Synthesereaktion

Probenmix	Enzymmix
1 µg Gesamt-RNA	4 µl 5 x RT Buffer
1 µl Oligo(dt)-Primer (100 ng/µl, 1:10 verdünnt)	1 µl dNTP-Mix (10 mM)
ad 12 µl H ₂ O	1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200u/µl)
	1 µl rRNAsin [®] (4u/µl)

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (*Mastercycler[®] gradient*, Eppendorf-AG) durchgeführt. Zunächst wurde die RNA bei 70° C für 5 min denaturiert um Sekundärstrukturen aufzulösen. Das Annealing des Oligo(dt)-Primers erfolgte während des Abkühlens auf 4° C. Nach der Zugabe von jeweils 7 µl Mastermix wurde 1 h bei 42° C inkubiert. Dabei fand die Transkription der mRNA in cDNA statt. Die Reverse Transkriptase wurde dann 5 min bei 95° C inaktiviert. Die Lagerung der cDNA-Proben erfolgte bei -20° C.

2.2.2.3 Quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine enzymatische exponentielle Replikationsmethode für Nukleinsäuren. Sie wurde von Kary B. Mullis 1987 entwickelt, der dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Zunächst wird die Template-DNA bei 90-95° C aufgeschmolzen, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen, die die DNA-Stränge zusammenhalten, aufgebrochen werden. Anschließend beginnt das sogenannte Annealing, bei dem die Oligonukleotid-Primer an die DNA-Matrize binden. Es folgt die Elongation, bei der die hitzestabile DNA-Polymerase die fehlenden komplementären DNA-Stränge mit freien Nukleotiden auffüllt. Diese Schritte werden in mehreren Zyklen wiederholt. Die quantitative Real-time PCR beruht auf dem herkömmlichen Prinzip der PCR, ermöglicht aber zusätzlich die gebildete DNA im Reaktionsverlauf zu quantifizieren. Das ist wichtig, da aufgrund des sigmoiden Reaktionsverlaufs nur durch die Detektion im Verlauf der logarithmischen Phase der Reaktion quantitative Aussagen hinsichtlich der eingesetzten Templatmenge gemacht werden können. In dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren werden mit Hilfe von DNA-bindenden, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen, wie *SYBR[®] Green* die anfallenden PCR-Produkte direkt während ihrer Bildung erfasst. Die Anzahl der Zyklen, die benötigt wird, bis das Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert überschreitet, wird als ct-Wert angegeben.

➤ Protokoll

Für alle Messwerte wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die cDNA wurde zuvor 1:5 verdünnt. Zunächst wurde der Mastermix pipettiert, der sich für jeden PCR-Ansatz wie folgt zusammensetzte:

11,5 µl H₂O
2 µl 10 x GenTherm[™] Polymerase-Buffer
1 µl MgCl₂ (50 mM)
1 µl SYBR[®] Green (1:40.000 in DMSO)
1 µl GenTherm[™] DNA-Polymerase (0,5u/µl)
0,5 µl Primer *forward* (20 pmol/µl)
0,5 µl Primer *reverse* (20 pmol/µl)
0,5 µl dNTP Mix (10 mM)

Anschließend wurden je 2 µl verdünnte cDNA zu den vorgelegten 18 µl Mastermix gegeben. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe des Plasmids angefertigt, die das gewünschte PCR-Produkt in bekannter Konzentration enthält. In der folgenden Übersicht (Tabelle 5) sind die Verdünnungsreihen für die unterschiedlichen Plasmide zusammengetragen.

Tabelle 5: Plasmidspezifische Verdünnungsreihen.

Plasmid	Verdünnungsreihe	Kopiezahlen
pRPS26	10^{-2} - 10^{-6}	1,66E+09 - 1,66E+05
pHAS1	10^{-5} - 10^{-9}	3,10E+07 - 3,10E+03
pHAS2	10^{-4} - 10^{-8}	4,76E+06 - 4,76E+02
pHAS3	10^{-4} - 10^{-8}	5,70E+06 - 5,70E+02
pHYAL1	10^{-4} - 10^{-8}	5,70E+06 - 5,70E+02
pHYAL2	10^{-4} - 10^{-8}	4,76E+06 - 4,76E+02
pHYAL3	10^{-4} - 10^{-8}	8,30E+06 - 8,30E+02

Die PCR-Reaktion wurde im *Rotor-GeneTM 3000 Thermocycler* von *Corbett Research* durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde für 15 Sekunden bei einer Temperatur zwischen 80 und 85° C gemessen. Die erhaltene PCR-Produktmenge wurde auf das unregulierte housekeeping-Gen RPS26 abgeglichen. Housekeeping-Gene weisen die Besonderheit auf, dass sie unabhängig von äußeren Einfüssen auf relativ stabilem Niveau unverändert exprimiert werden. Die primerspezifischen Annealing und Fluoreszenzdetektions-Temperaturen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Primerspezifische Annealing und Fluoreszenzdetektions-Temperaturen

Primer	T Annealing	T Fluoreszenzmessung
<i>pRPS26</i>	61° C	80° C
<i>pHAS1</i>	62° C	86° C
<i>pHAS2</i>	58° C	80° C
<i>pHAS3</i>	58° C	81° C
<i>pHYAL1</i>	60° C	83° C
<i>pHYAL2</i>	60° C	84° C
<i>pHYAL3</i>	60° C	85° C

➤ Auswertung

Für die detektierten Fluoreszenzsignale der Standardplasmide und Proben wurde ein Schwellenwert (Treshold) bestimmt, bei dem eine annähernd optimale Verteilung der Standardreihe erreicht wurde. Diese Eichgerade (siehe Abbildung 7) bildete die berechneten Standardkonzentrationen gegen die Schwellenwerte (Ct-wert = Zykluswert, bei dem die Produktfluoreszenz den Schwellenwert erstmals überschreitet) ab. Damit war es möglich die ursprüngliche Templatmenge der einzelnen Proben aus der Eichgerade abzulesen. Die entsprechenden Standardkurven wurden sowohl für das housekeeping-Gen RPS26 als auch für die untersuchten Gene HAS1/2/3 und HYAL1/2/3 erfasst. Die Ergebnisse wurden als Quotient der Kopiezahlen von Zielgen- und RPS26-Expression dargestellt und als arbitrary units (AU) bezeichnet. Daraus ergab sich folgende Formel:

$$AU = (\text{copiezahl}_{(\text{Zielgen})} / \text{copiezahl}_{(\text{RPS26})}) * 10000$$

Diese künstliche Masseinheit ermöglichte den Umgang mit überschaubaren Zahlenwerten und war proportional zur Anzahl des Templates.

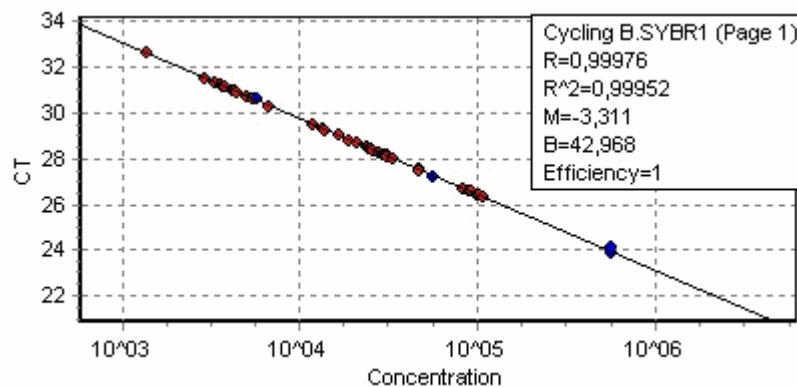


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung einer Eichgeraden nach Amplifizierung des Gens HYAL1.

Blau: Standardreihe des Plasmid HYAL1, Rot: untersuchte PCR-Proben

Schmelzkurve

Um die Qualität der gewonnenen Fluoreszenzsignale zu beurteilen, wurde eine Schmelzkurve erstellt. Bei einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung von 50 °C auf 95 °C wurde die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen und der interkalierte Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Folglich wurde eine Fluoreszenzabnahme registriert. Die Schmelztemperatur der doppelsträngigen DNA hängt hochspezifisch von ihrer Länge, ihrer Sequenz und den Pufferbedingungen ab. Somit können z.B. spezifische PCR-Produkt von Primerdimeren unterschieden werden, und es kann eine Aussage über die Reinheit des Fluoreszenzsignals

getroffen werden. In Abbildung 8 ist die Ableitung einer Schmelzkurve exemplarisch dargestellt

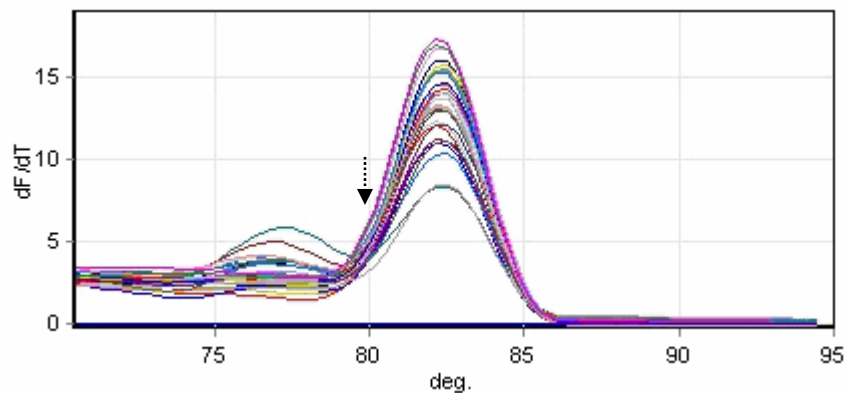


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Schmelzkurve für das PCR-Produkt der mRNA von HAS2, bei der der Schmelzpunkt der Primerdimere bei 78° C, die der spezifischen PCR-Produkte bei 83° C lag. Die Temperatur für die Fluoreszenzmessung wurde auf 80° C festgelegt (siehe Pfeil).

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Visualisierung der Größe von HA-Molekülen im Kulturüberstand

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um eine analytische Methode bei der verschiedene Arten von Molekülen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes getrennt werden können. Das Gel bildet dabei eine dreidimensionale Netzstruktur aus, welche von den geladenen Molekülen oder Ionen auf dem Weg zur entgegen geladenen Elektrode durchlaufen werden muss. Agarose-Gele sind relativ großporige Gele, die sich gut zur Trennung von DNA oder hochmolekularen Proteinen eignen. Um die Hyaluronsäuremoleküle aus den FKS-freien Kulturüberständen (siehe 2.2.1.6) zu trennen, wurde zunächst ein 0,5 cm dickes 0,5%iges Agarosegel hergestellt. Dabei wurde die Agarose in einem 1 × TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und konnte nach Abkühlung auf ca. 60° C gegossen werden. Das erstarrte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Puffer bedeckt. Die Proben der HA-Überstände wurden so eingestellt, dass sich in jeder Probe jeweils 50 ng HA befanden. Die HA-Konzentrationen der einzelnen Proben waren zuvor mit Hilfe eines HA-ELISA (siehe 2.2.3.2) bestimmt worden. Anschließend wurden die HA-Proben (20-50 µl) mit 16% (v/v) 6×DNA-loading Buffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Der Farbstoff des Ladepuffers ermöglicht eine visuelle Kontrolle der Elektrophorese sowohl beim Befüllen der Geltaschen als auch bei der Markierung der Lauffront. Neben dem Farbstoff enthält der Ladepuffer noch Glycerol, der durch eine hohe Dichte das Absinken der Proben in der Geltasche bewirkt. Als Längen- und Mengenstandard

wurde Healon, eine hochmolekulare HA, in zwei verschiedenen Konzentrationen (50 ng, 100 ng) mitgeführt. Anschließend wurden die HA-Moleküle bei einer Spannung von 50 V für 4 h aufgetrennt. Um die nach ihrer Größe getrennten Moleküle für Nachweismethoden zugänglich zu machen, wurden sie auf eine Trägermembran übertragen. (siehe 2.2.2.4)

2.2.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

2.2.3.1 HA-Transfer auf eine Membran und Immunodetektion („HA-Western Blot“)

Die Größenanalyse der HA-Moleküle wurde entsprechend dem Protokoll von Ducale *et al.* (2005)⁸¹ durchgeführt. Nach Trennung der HA-Moleküle durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.2.4) wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, um die getrennten Moleküle für Nachweismethoden zugänglich zu machen. Die als Trägermembran fungierende Nitrocellulosemembran wurde zunächst 5 min mit 1%igem Cetylpyridiniumchlorid (in 30% Isopropanol) und 15 min mit 150 mM NaCl vorbehandelt. Währenddessen konnte die Blotkammer aus Filterpapier, dem Gel (Oberseite nach unten) und der vorbehandelten Nitrocellulosemembran (auf die Gelunterseite) zusammengesetzt werden. Anschließend wurden mehrere Schichten Filterpapier sowie Zellstoffpapier zugelegt und der Blot über Nacht bei 4° C inkubiert. Der Transfer erfolgte aufgrund von Kapillarkräften in 100 mM TRIS-Acetat. Unspezifische Proteinbindungsstellen an der Membran wurden danach durch eine 6 stündige Inkubation in Blocking-Puffer abgesättigt. Anschließend wurde die Blotting-Membran über Nacht bei 4° C mit biotinyliertem Hyaluronssäure-Bindungsprotein (2 µg/ml) in Blocking-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschschrte mit Blocking-Puffer abgestoppt. Es folgte die Zugabe von peroxidase-gekoppeltem Streptavidin in 10 ml Blocking-Puffer und eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nicht gebundenes Streptavidin wurde anschließend mit Hilfe des Blocking-Puffers entfernt. Im letzten Schritt wurde der Blot entwickelt und damit die unterschiedlichen Größenverhältnisse der HA-Moleküle sichtbar gemacht. Dazu wurden Reagenz 1 und 2 aus dem *ECL Western Blotting Substrate* von *Pierce Perbio Science GmbH* im Verhältnis 1:1 gemischt und auf den Blot gegeben. Nach einer Einwirkzeit von einer Minute wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und es erfolgte die Aufnahme der durch die Peroxidasereaktion ausgelösten Chemolumineszenz, mit einer CCD-Kamera.

2.2.3.2 Hyaluronsäure-Quantifizierung im Kulturüberstand

Als ELISA wird ein immuologisches Nachweisverfahren bezeichnet, bei dem das Antigen über eine enzymatische Farbreaktion quantitativ gemessen werden kann. Für den Nachweis

von HA aus Kulturüberständen wurde der HA-Kit der Firma Corgenix verwendet. Die Kavitäten der entsprechenden im Kit enthaltenen Mikrotiterplatte (MTP) sind mit Hyaluronsäure-Bindungsprotein (HA-BP) beschichtet. In den Untersuchungen wurden Doppelbestimmungen für HA-Standards und Patientenproben durchgeführt. Der 0 ng/ml HA-Standard wurde nur mit Reaktionspuffer befüllt und als Reagenzienleerwert gemessen. Um den Nullpunkt des MTP-Lesegeräts vor dem späteren Messschritt einzustellen, wurde eine Kavität als Substrateerwert unbenutzt gelassen und erst vor dem Auswerten der Platte mit 200 µl analysenreinem Wasser befüllt. Zunächst wurden die Patientenproben 1:5 mit Reaktionspuffer vorverdünnt und der Kit auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde der HA-Testkit entsprechend den Herstellerangaben abgearbeitet. Damit ein ausreichendes Probenvolumen zur Verfügung stand, wurden Patientenproben und Standards 1:10 mit Reaktionspuffer verdünnt. Die Kavitäten der MTP wurden jeweils mit 100 µl verdünntem Standard (50, 100, 200, 500, 800 ng/ml) oder Patientenproben gefüllt. Es folgte ein 60 minütiger Inkubationsschritt, bei dem die HA der Patientenproben und die der HA-Standards mit dem HA-BP der beschichteten Kavitäten reagierte. Anschließend wurden durch einen Waschschrift mit PBS-Arbeitswaschlösung ungebundene Moleküle entfernt. Nun wurden jeweils 100 µl an Meerrettich-Peroxidase konjugiertes HA-BP zugesetzt, die während einer Inkubationszeit von 30 min Komplexe mit gebundener HA bildeten. Es folgte ein weiterer Waschschrift, der wie bereits beschrieben durchgeführt wurde. Anschließend wurden jeweils 100 µl Substrat (chromogenes Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid) mit gleichmäßigem Tempo in die Kavitäten gegeben, woraufhin es während der 30 minütigen Inkubation zu einer Farbreaktion kam. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) pro Vertiefung beendet. Mit einem MTP-Photometer wurde die Absorption bei 450 nm gemessen und in optischen Dichteeinheiten (OD/cm) angegeben. Die HA-Spiegel der Patientenproben konnten mit Hilfe der Eichkurve abgelesen werden.

2.2.4 Immunhistochemische Methoden

2.2.4.1 Hyaluronsäurefärbung

Zunächst trockneten die bereits angefertigten Kryoschnitte (siehe 2.2.1.8) über Nacht bei Raumtemperatur. Am folgenden Tag wurden sie 10 min in kaltem Aceton (-20° C) fixiert und mindestens 0,75 bis 1 h getrocknet. Anschließend wurden sie kurz mit SPP benetzt und zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit 1%igem BSA in SPP inkubiert. Nun erfolgte die Inkubation der Kryoschnitte

mit biotinyliertem HA-BP (3 µg/ml in SPP) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4° C. Als Negativkontrolle wurden stets Schnitte mitgeführt, deren HA zuvor mit 100 U Hyaluronidase in 50 µl Formiatpuffer verdaut worden war. Um nach Ablauf der Inkubationszeit überschüssigen Antikörpers zu entfernen, wurden die Schnitte ausführlich mit SPP und 1 × PBS/0.1% Tween gewaschen. Mit dem *Super Sensitive™ Link-Label IHC Detection System* (BioGenex Laboratories) erfolgte entsprechend den Herstellerangaben die Inkubation mit Enzym-markiertem Streptavidin. Anschließend wurden die Schnitte mit 1 x PBS/0,1 % Tween gewaschen. Der gesamte Antikörper-Enzym-Komplex konnte mit Hilfe des *New Fuchsin Substrate System* (Dako Dänemark A/S), unter Zugabe von 100 µl Levamisol (Stammlösung 400 mM) sichtbar gemacht werden. Durch destilliertes Wasser wurde die Farbreaktion abgestoppt. Die Gegenfärbung des Objektträgers erfolgte mit Hämalun. Nach dem „Bläuen“ unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte mit Hilfe von Aquatex® (Merck KGaA) mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte unter Benutzung des Lichtmikroskops *Olympus BX41*.

2.2.5 Graphische Auswertung und statistische Analyse

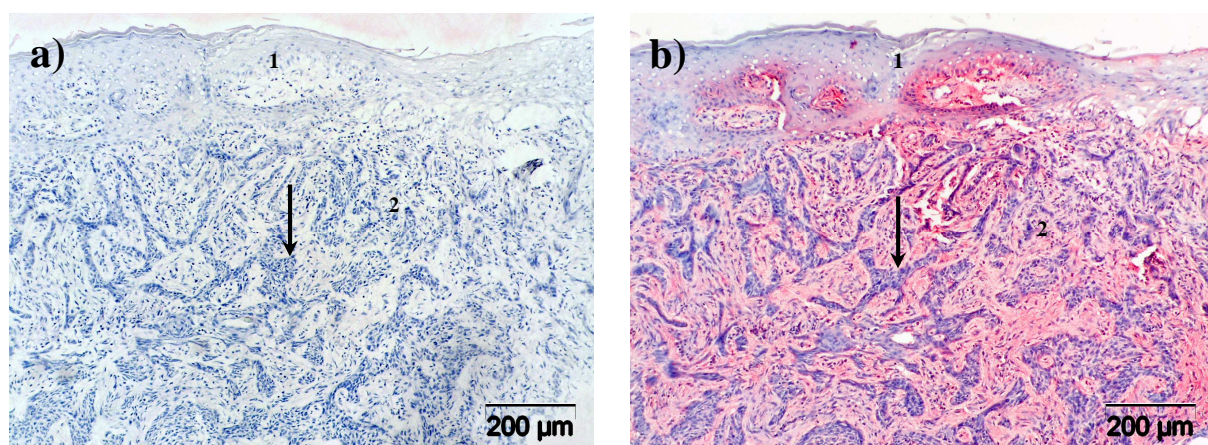
Schematische Darstellungen und fotografische Aufnahmen mikroskopischer Schnitte wurden mit Hilfe der Programme *Adobe Photoshop CS* und *Microsoft Office 2003/2007* angefertigt und aufbereitet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen *SigmaPlot® 9.0* und *GraphPad Prism 4.0*. Bei Mehrfachbestimmungen wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Ermittlung der Signifikanz zwischen Gruppen normalverteilter Stichproben erfolgte durch die Anwendung des t-Tests. Bei nicht normalverteilten Stichproben wurde hingegen der Mann-Whitney Rangsummentest (MWRS) als statistisches Verfahren angewendet.

3 ERGEBNISSE

Die Regulation des HA-Stoffwechsels durch tumorassoziierte FB stand im Rahmen dieser Studie im Mittelpunkt der Untersuchungen. Anhand der erhobenen Daten sollte geklärt werden, ob sich FB aus unterschiedlichen definierten Bereichen des Mittelgesichtes hinsichtlich ihrer HA-Synthese, HA-Molekülgröße, Expression der HA-relevanten Stoffwechsellzyme und ihrer Stimulierbarkeit durch ausgewählte Mediatoren wie TGF- β_1 und PDGF-BB unterscheiden.

3.1 Untersuchung der Hyaluronsäure-Verteilung im Gewebe mittels Hyaluronsäure-Bindungsprotein

Um zunächst einen optischen Eindruck von der HA-Verteilung zum einen zwischen tumornahen (TM) und tumorfernen (RF) Gewebeproben und zum anderen innerhalb und außerhalb der embryonalen Fusionszone zu erlangen, wurde die HA mittels HA-BP sichtbar gemacht. Detektierte HA-Moleküle färbten sich dabei rot. Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung mit Hämalaun blau angefärbt. Insgesamt wurden 40 entsprechende Kryoschnitte gefärbt und begutachtet, wobei 20 innerhalb und 20 außerhalb der eFZ lokalisiert waren. Exemplarisch sind in den Abbildungen 9 und 10 jeweils vier Gewebeschnitte aus dem Bereich der eFZ sowie vier außerhalb der eFZ dargestellt.



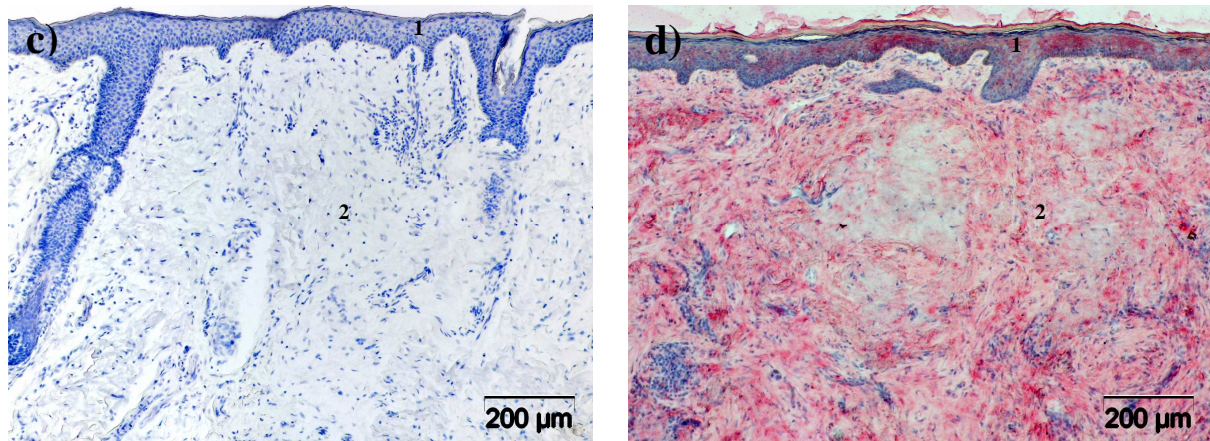


Abbildung 9: HA-Färbungen mit HA-BP von Gewebe innerhalb der eFZ.

Gegenfärbung Hämalaun (blau), a) BZK: HA-Verdau mit Hyaluronidase, b) HA-Verteilung zwischen den BZK Tumornestern c) Gesundes Gewebe: HA-Verdau mit Hyaluronidase, d) HA-Verteilung im gesunden Gewebe
1) Epidermis, 2) Dermis, Tumornest siehe Pfeil

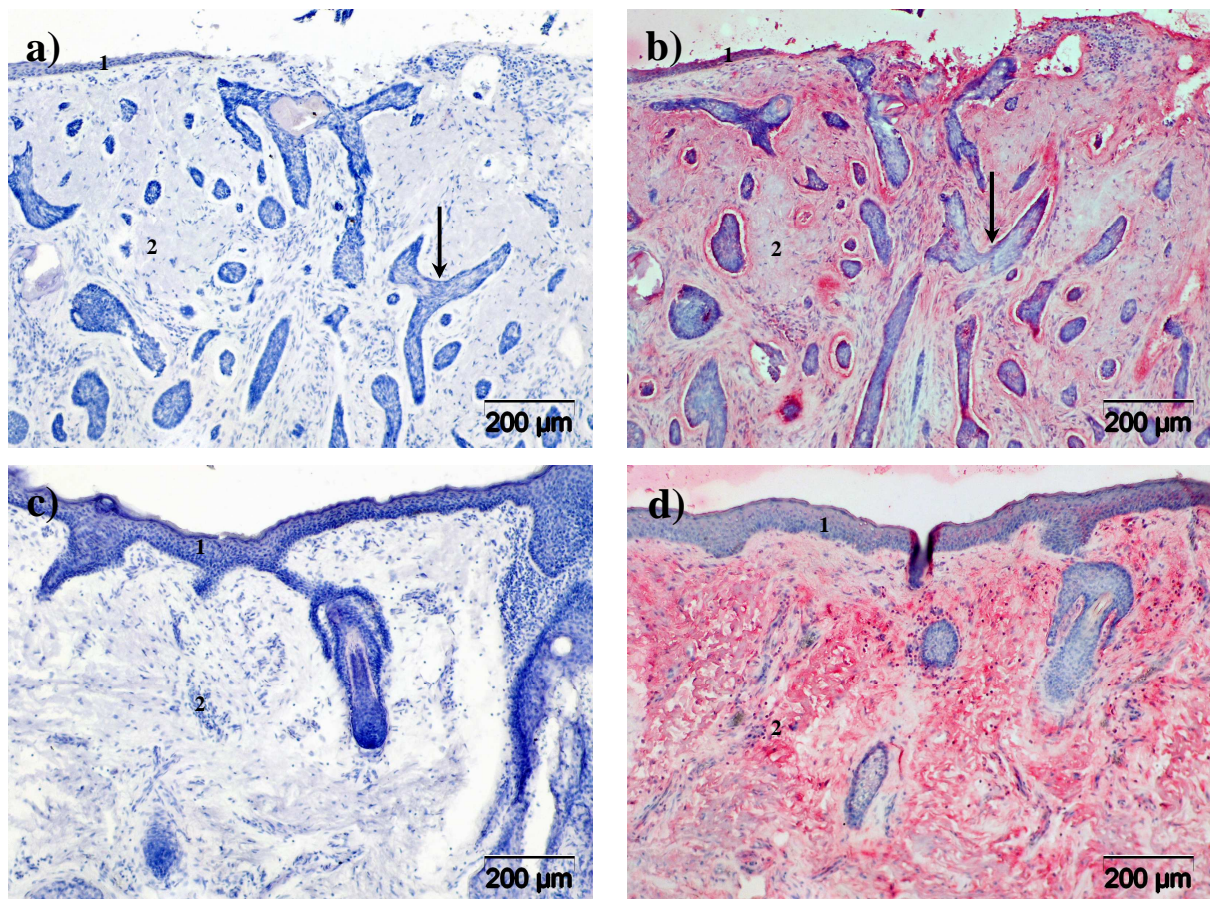


Abbildung 10: HA-Färbungen mit HA-BP von Gewebe außerhalb der eFZ.

Gegenfärbung Hämalaun (blau), a) BZK: HA-Verdau mit Hyaluronidase, b) HA-Verteilung zwischen den BZK Tumornestern c) Gesundes Gewebe: HA-Verdau mit Hyaluronidase, d) HA-Verteilung im gesunden Gewebe
1) Epidermis, 2) Dermis, Tumornest siehe Pfeil

Auf den in Abbildung 9 und 10 angefärbten Gewebeschnitten konnte die HA-Verteilung in der Epidermis (1) und der Dermis (2) gut sichtbar dargestellt werden. Wie in Abbildung 9d/10d ersichtlich stellt sich die Dermis (2) im Gegenteil zur Epidermis (1) und Subkutis (nicht gezeigt) im untersuchten Referenzgewebe als ein HA-reiches Kompartiment dar. Die vorwiegend in dieser Hautschicht ansässigen FB sind als Hauptproduzenten von HA offensichtlich für die nachweisbaren physiologischen HA-Akumulationen verantwortlich. In der Epidermis (1) ist wiederum kaum HA detektierbar, nur wenige Moleküle lassen sich im Interstitium der Zellen abbilden. Auch bei der Betrachtung der bearbeiteten BZK-Schnitte (siehe Abbildung 9b/10b) zeigten sich zwischen den einzelnen Tumorzellnestern (siehe Pfeil) Ansammlungen von HA, die sich allerdings innerhalb (9b) und außerhalb (10b) der eFZ optisch nicht quantitativ unterschieden. Währenddessen konnten in beiden Kompartimenten zwischen den Tumorzellen selbst so gut wie keine HA-Moleküle angefärbt werden. Bei der optischen Auswertung der Schnitte konnten wie bereits angedeutet keine wesentlichen Unterschiede in der HA-Verteilung zwischen Tumor und Referenzgewebe sowohl innerhalb (9b/9d) als auch außerhalb der embryonalen Fusionszone (10b/10d) festgestellt werden. Auch beim direkten Vergleich der beiden untersuchten Kompartimente (Abbildung 9b/10b)) ließen sich innerhalb und außerhalb der eFZ keine Differenzen hinsichtlich des HA-Musters nachweisen. Als Negativkontrolle wurde die HA beider Zonen sowohl im BZK (Abbildung 9a/10a) als auch im Referenzgewebe (Abbildung 9c/10c) zuvor mit Hilfe von Hyaluronidase verdaut. Wie zu erwarten waren anschließend keine HA-Moleküle mehr sichtbar, womit die Spezifität der Färbemethode gezeigt werden konnte.

3.2 Quantifizierung der Hyaluronsäure-Konzentration mittels ELISA

Mittels ELISA wurden in den Kulturüberständen von FB der ersten Passage aus unterschiedlichen Kompartimenten des Mittelgesichtes die HA-Konzentrationen bestimmt (siehe Abbildung 11). Ausgangszelldichte und Inkubationsdauer wurden standardisiert eingehalten.

Es zeigte sich zum einen, dass sich die Menge der durch tumornahe FB freigesetzten HA *in vitro* nicht signifikant von der aus Referenzproben unterscheidet. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede ($P > 0.05$) für den Vergleich beider Gruppen ermittelt. Darüber hinaus ließen sich auch im Vergleich von HA-Konzentrationen innerhalb und außerhalb der embryonalen FZ keine signifikanten Unterschiede nachweisen ($P > 0.05$ im t-Test, $P > 0,05$ im MWRS-Test).

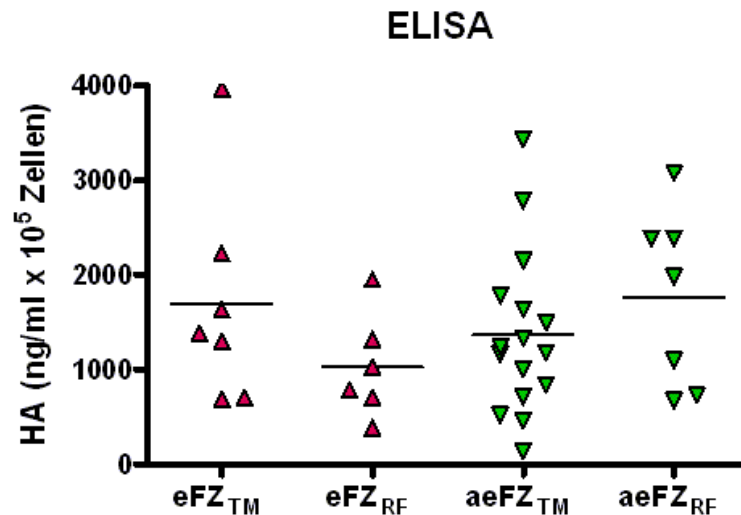


Abbildung 11: HA-ELISA der Kulturüberstände von primären Fibroblasten der 1.Passage nach Lokalisation der Probebiopsie.

Rosa: BZK innerhalb der eFZ (eFZ_{TM}) und entsprechende Referenzprobe (eFZ_{RF})

Grün: BZK außerhalb der eFZ (aeFZ_{TM}) und entsprechende Referenzprobe (aeFZ_{RF})

3.3 Untersuchung der Größe der Hyaluronsäure-Moleküle mittels „Westernblot“

Wie in Abschnitt 1.3.2 erwähnt, können von HA-Synthetasen gebildete HA-Moleküle durch unterschiedliche Molekülgrößen charakterisiert sein. Ein Polymer besteht typischerweise aus $n > 10^3$ Disaccharid Einheiten. In das Stroma abgegebene HA-Moleküle binden entsprechend ihrer Größe an spezifische extrazelluläre oder oberflächliche HA-Bindeproteine und nehmen folglich verschiedene Funktionen im Zellstoffwechsel wahr. Um zu untersuchen ob sich HA-Moleküle innerhalb und außerhalb der eFZ anhand ihrer Molekülgröße unterscheiden, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung der HA-Moleküle durchgeführt. Nach Membrantransfer wurde die aufgetrennte HA spezifisch nachgewiesen und visualisiert („HA-Western“). Als Standard wurde Healon, ein klinisch zugelassenes HA-Präparat, in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (50 ng und 100 ng) mitgeführt.

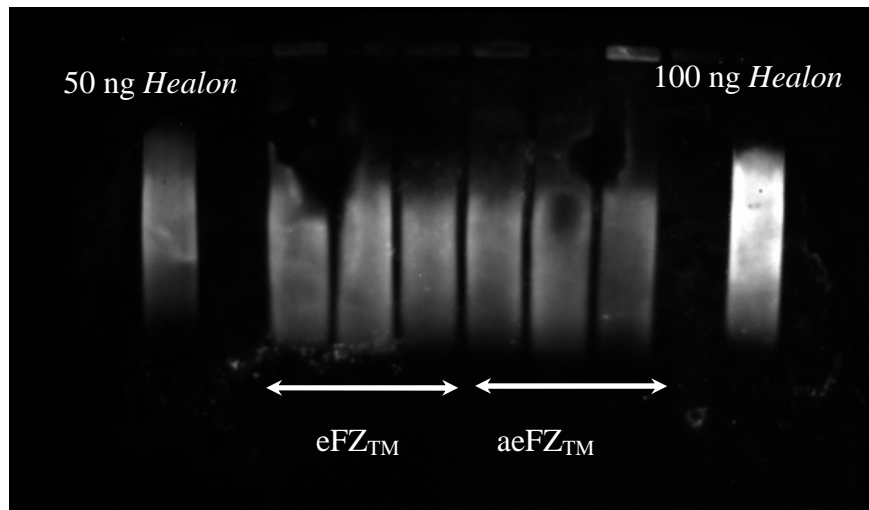


Abbildung 12: Bestimmung der HA-Molekülgröße mittels „HA-Western“ mit biotinyliertem HA-BP. Serumfreie Kulturüberstände von je 3 Kulturen tumornaher Fibroblasten aus der eFZ und außerhalb der eFZ wurden auf ca. 50 ng HA eingestellt, wie beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und nach Blotting visualisiert. Healon wurde in 2 Konzentrationen als Standard mitgeführt. Sekundärantikörper= a-biotin POD; HA-Standard= Healon 50 ng, Healon 100 ng

Die Größe der drei aufgetragenen Tumorproben aus der eFZ (siehe Abbildung 12, linker Pfeil) unterschieden sich hinsichtlich der Größenverteilung untereinander nicht von denen außerhalb der eFZ (siehe Abbildung 12, rechter Pfeil). Alle Proben aus den Kulturüberständen zeigten eine identische Größenverteilung, die etwas unter der des Healon-Standards (3.500.000-4.100.000 Da, ungefähre Angaben nach Körner *et al.*, 1985) lagen. Die Signalintensitäten der Tumorproben lagen im Bereich der Healonkonzentration von 50 ng/Spur und bestätigten somit die Messwerte aus dem ELISA.

3.4 Nachweis der Hyaluronsäure-verstoffwechselnden Enzyme mittels Realtime qPCR

Im Folgenden wurden die entsprechenden basalen Expressionsraten der HA-verstoffwechselnden Enzyme auf mRNA Ebene untersucht. Es sind drei aufbauende (HAS1, 2, 3) und drei abbauende (HYAL1, 2, 3) Enzyme bekannt (siehe 1.3.2).

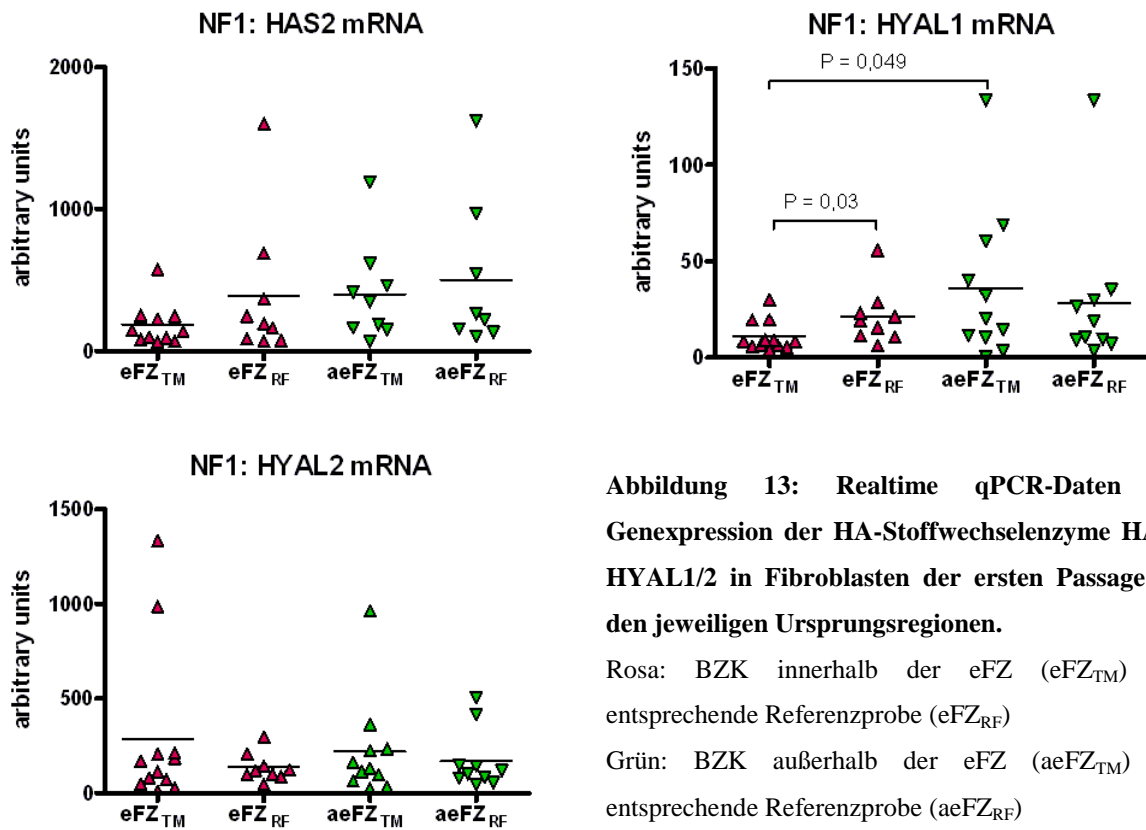


Abbildung 13: Realtime qPCR-Daten zur Genexpression der HA-Stoffwechsellzyme HAS2, HYAL1/2 in Fibroblasten der ersten Passage aus den jeweiligen Ursprungsregionen.

Rosa: BZK innerhalb der eFZ (eFZ_{TM}) und entsprechende Referenzprobe (eFZ_{RF})

Grün: BZK außerhalb der eFZ (aeFZ_{TM}) und entsprechende Referenzprobe (aeFZ_{RF})

Wie in Abbildung 13 dargestellt, zeigten sich mittels Realtime qPCR keine signifikanten Differenzen in den Syntheseraten für HAS2- sowie HYAL2 mRNA zwischen tumornahen und tumorfernen FB der ersten Passage ($P > 0,05$ im MWRS-Test). Tumorfibroblasten innerhalb der eFZ synthetisierten dagegen signifikant ($P = 0,03$ im MWRS-Test) weniger HYAL1 mRNA als die entsprechenden Referenzfibroblasten. Sowohl innerhalb als auch außerhalb der eFZ wurden für HAS2 sowie HYAL2 vergleichbare Mengen an Synthetasen und Hyaluronidasen exprimiert ($P > 0,05$ im MWRS-Test). Auffällig war hingegen die verstärkte basale HYAL1 mRNA Synthese in Tumorgewebe außerhalb der eFZ, die ebenfalls in Abbildung 13 erkennbar ist ($P = 0,043$ im MWRS-Test). Weiterhin zeigte sich eine deutliche Streuung der Werte außerhalb der eFZ, die als Folge der sehr großflächigen Definition dieser Zone interpretierbar ist (siehe 2.1.7). HAS1/3 sowie HYAL3 konnten in unstimulierten FB der ersten Generation nicht ausreichend detektiert werden und spielen in Übereinstimmung mit anderen Autoren keine wesentliche Rolle für den HA-Stoffwechsel unstimulierter FB in 2D Kulturen.

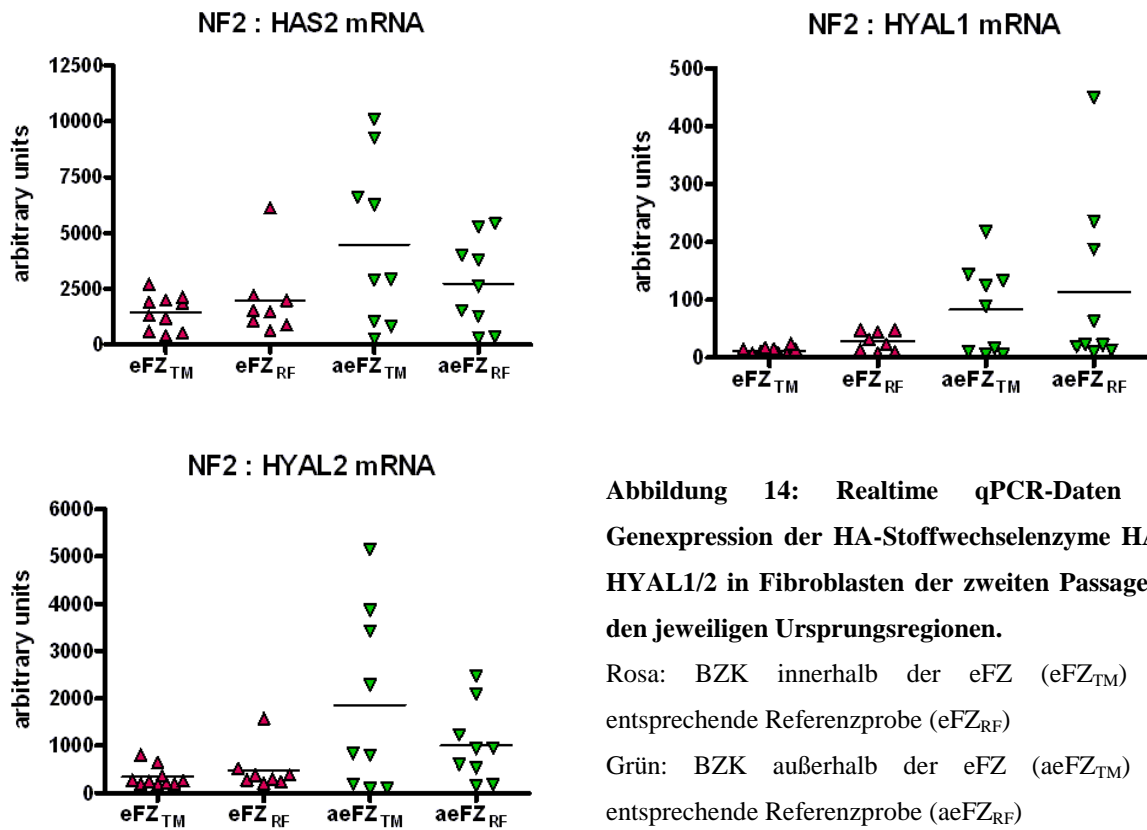


Abbildung 14: Realtime qPCR-Daten zur Genexpression der HA-Stoffwechsellzyme HAS2, HYAL1/2 in Fibroblasten der zweiten Passage aus den jeweiligen Ursprungsregionen.

Rosa: BZK innerhalb der eFZ (eFZ_{TM}) und entsprechende Referenzprobe (eFZ_{RF})

Grün: BZK außerhalb der eFZ (aeFZ_{TM}) und entsprechende Referenzprobe (aeFZ_{RF})

Wie in Abbildung 14 ersichtlich unterschieden sich Tumor und Referenzen auch in der zweiten Generation nicht hinsichtlich ihrer Syntheseraten für HAS2- sowie HYAL1- und 2 mRNA ($P > 0,05$ im t-Test, $P > 0,05$ im MWRS-Test). Sowohl innerhalb als auch außerhalb der eFZ wurden auch in der zweiten Passage vergleichbare Mengen an Synthetasen und Hyaluronidasen exprimiert ($P > 0,05$ im t-Test, $P > 0,05$ im MWRS-Test).

Dennoch zeigten sich außerhalb der eFZ tendenziell höhere Expressionen für HAS2 als auch für HYAL1 und 2. Eventuell deutet sich hier eine erhöhte Umsatzrate für HA außerhalb der eFZ an.

3.5 Ansprechrate der Fibroblasten auf TGF- β_1 und PDGF-BB

TGF- β_1 und PDGF-BB sind als Induktoren der HA-Synthetasen bereits bekannt (siehe 1.3.1). Laut Literatur erweist sich PDGF-BB dabei als stärkerer Stimulator als TGF- β_1 ⁵⁰, dessen Wirkung auf HA-Synthetasen umstritten ist (siehe 1.3.1). Die Reaktion der HA-Hyaluronidasen auf entsprechende Wachstumsfaktoren wurde mehrfach kontrovers diskutiert⁵⁰. Im Folgenden wurde die mRNA Expression der expandierten Fibroblastenkulturen von

HAS2, HYAL1 und HYAL2 nach Stimulation mit 10 ng/ml TGF- β_1 sowie PDGF-BB dargestellt und statistisch untersucht.

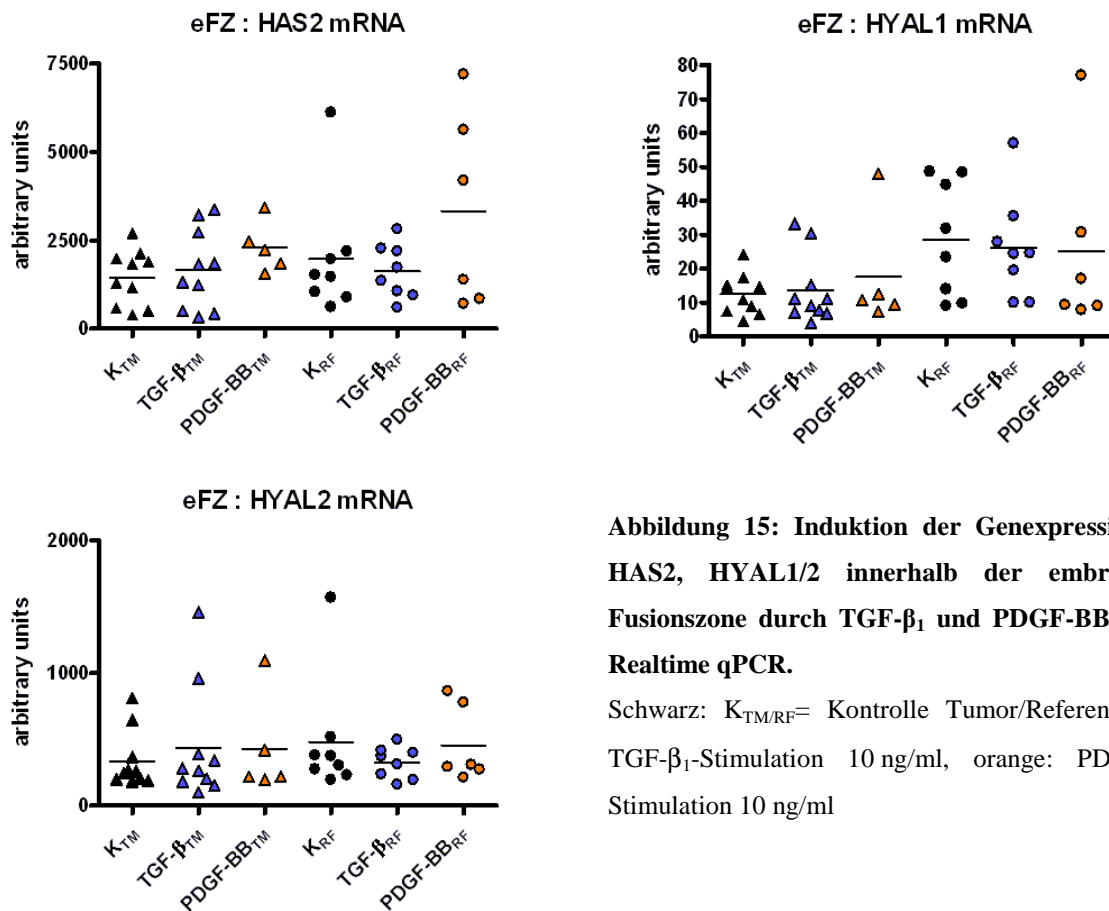


Abbildung 15: Induktion der Genexpression von HAS2, HYAL1/2 innerhalb der embryonalen Fusionszone durch TGF- β_1 und PDGF-BB mittels Realtime qPCR.

Schwarz: K_{TM/RF} = Kontrolle Tumor/Referenz, blau: TGF- β_1 -Stimulation 10 ng/ml, orange: PDGF-BB-Stimulation 10 ng/ml

Wie in Abbildung 15 dargestellt konnten im Rahmen der Stimulationsversuche mit TGF- β_1 und PDGF-BB innerhalb der eFZ keine signifikanten Unterschiede bezüglich der HA-Enzym Expression zwischen Tumor- und Referenzgewebe nachgewiesen werden ($P > 0,05$ im t-Test, $P > 0,05$ im MWRS-Test). Es zeigte sich allerdings die Tendenz, dass HAS2 vor allem in tumorfernen FB durch PDGF-BB induzierbar ist. Die Wirkung von TGF- β_1 auf HAS2 schien vernachlässigbar gering. Die HA-degradierenden Enzyme HYAL1 und HYAL 2 wurden weder durch TGF- β_1 noch durch PDGF-BB reguliert.

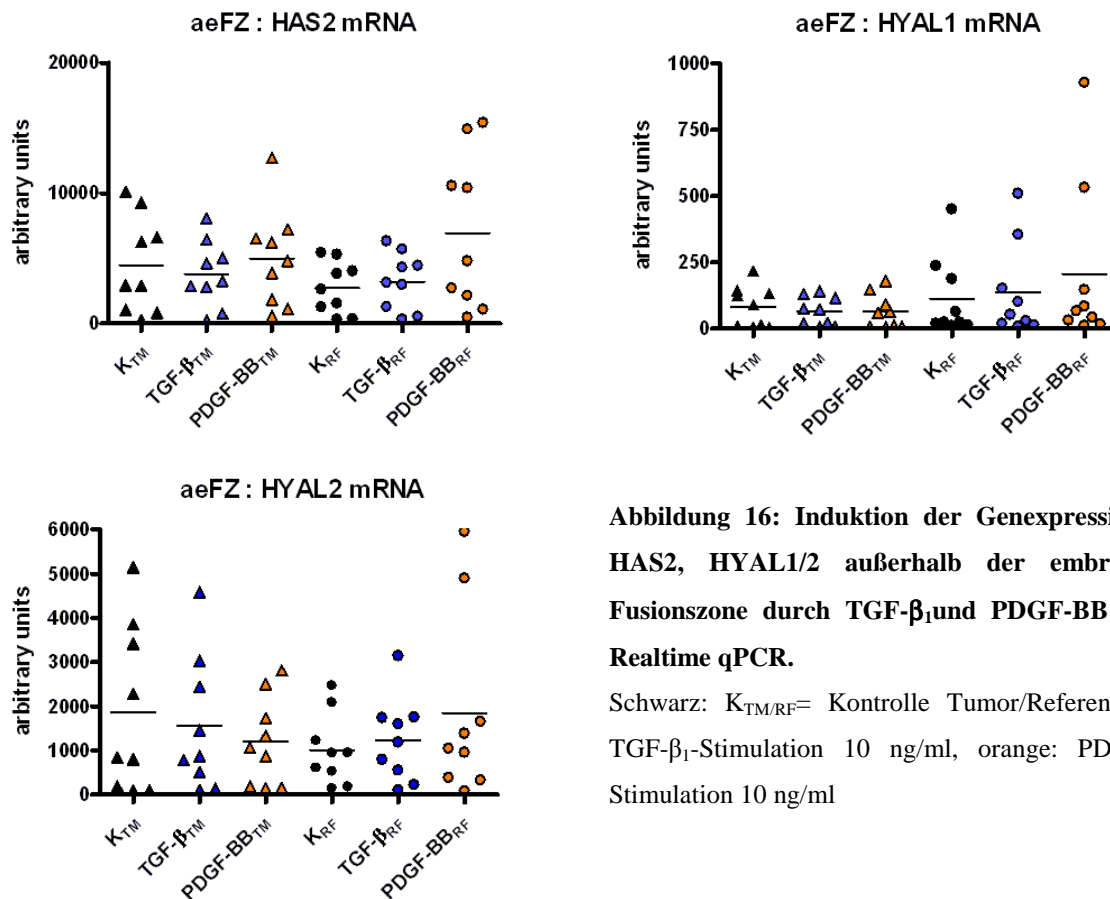


Abbildung 16: Induktion der Genexpression von HAS2, HYAL1/2 außerhalb der embryonalen Fusionszone durch TGF- β_1 und PDGF-BB mittels Realtime qPCR.

Schwarz: $K_{TM/RF}$ = Kontrolle Tumor/Referenz, blau: TGF- β_1 -Stimulation 10 ng/ml, orange: PDGF-BB-Stimulation 10 ng/ml

Auch außerhalb der eFZ, wie in Abbildung 16 ersichtlich, ließen sich keine signifikanten Differenzen zwischen tumornahen und tumorfernen FB hinsichtlich ihrer Ansprechrate auf die Mediatoren TGF- β_1 und PDGF-BB detektieren ($P > 0,05$ im t-Test, $P > 0,05$ im MWRS-Test). Eine erfolgreiche HAS2 Induktion konnte ebenfalls nur in tumorfernen FB registriert werden. PDGF-BB erwies sich wie zu erwarten als stärkerer Induktor von HAS2 als TGF- β_1 , dessen Wirkung wiederholt gering ausfiel. HYAL1 und 2 zeigten auch außerhalb der eFZ keine erkennbare Reaktion auf die zugeführten Mediatoren ($P > 0,05$ im t-Test, $P > 0,05$ im MWRS-Test)

Um vergleichen zu können, ob sich tumornahen FB innerhalb und außerhalb der eFZ bezüglich der Induzierbarkeit der HA-Synthese und des HA-Abbaus durch TGF- β_1 und PDGF-BB unterscheiden, wurden beide Kompartimente in Abbildung 17 gegenübergestellt. Neben dem bereits in Abbildung 14 gezeigten erhöhten Turnover des HA-Stoffwechsels in FB außerhalb der eFZ, zeigten sich mit einer Ausnahme keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Induktion der HA-Synthese bzw. des HA-Abbaus ($P > 0,05$ im t-Test, $P > 0,05$ im MWRS-Test). Lediglich HYAL1 mRNA wurde mit einer Signifikanz von $P = 0,045$ (im MWRS-Test) nach einer 3 stündigen TGF- β_1 Stimulation außerhalb der eFZ stärker exprimiert als innerhalb der eFZ unter gleichen Bedingungen. Dennoch konnten in tumornahen FB innerhalb bzw.

außerhalb der eFZ nur geringe Anzeichen für einen verstärkten HA-Stoffwechsel gefunden werden.

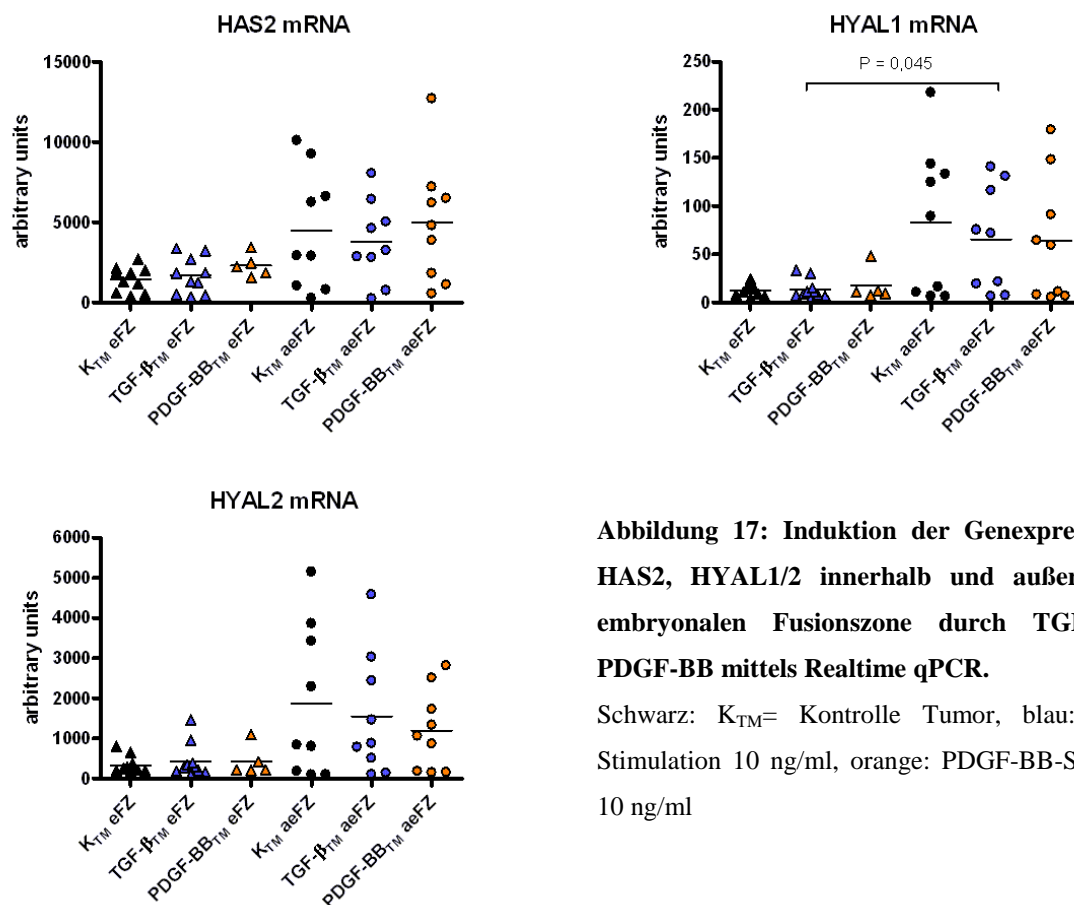


Abbildung 17: Induktion der Genexpression von HAS2, HYAL1/2 innerhalb und außerhalb der embryonalen Fusionszone durch TGF-β₁ und PDGF-BB mittels Realtime qPCR.

Schwarz: K_{TM}= Kontrolle Tumor, blau: TGF-β₁-Stimulation 10 ng/ml, orange: PDGF-BB-Stimulation 10 ng/ml

Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen

- ❖ Aus den erhaltenen Biopsieproben konnten auch aus kleinsten Gewebestücken analysierbare FB-Kulturen gewonnen werden.
- ❖ FB exprimieren HA in der Dermis von gesunder Haut sowie im Stroma von Tumoren. BZK-Tumorzellen bilden kaum HA.
- ❖ FB produzieren *in vitro* unabhängig vom Herkunftsgewebe ähnliche Mengen von HA. In unmittelbarer Tumornähe ist keine erhöhte HA-Synthese der FB nachweisbar.
- ❖ Die HA-Moleküle, die die FB *in vitro* in den Kulturüberstand sezernieren, zeigen eine vergleichbare molekulare Größe und unterscheiden sich nicht bezüglich Quelle bzw. Herkunft der produzierenden FB.
- ❖ HAS2 und Hyal1, 2 sind die wesentlichen Enzyme des HA-Stoffwechsels in allen untersuchten FB.

- ❖ Nach kurzer *in vitro* Kultur (eine FB-Passage) unterscheiden sich FB außerhalb und innerhalb der eFZ nicht hinsichtlich des HA-Stoffwechsels und der Expression der am HA-Stoffwechsel beteiligten Enzyme.
- ❖ Nach längerer Kultivierung (zwei FB-Passagen) zeichnet sich ein erhöhter Turnover des HA-Stoffwechsels in FB außerhalb der eFZ ab, was anhand gesteigerter Expressionen von HAS2 sowie Hyal1 bzw. 2 mRNA deutlich wurde.
- ❖ HAS2 ist nur in tumorfernen FB durch PDGF-BB induzierbar. Die Wirkung von TGF- β_1 führt nicht zur Induktion von HAS2 weder in tumorfernen noch in tumornahen FB. Nach Stimulation mit TGF- β_1 sowie PDGF-BB sind keine Unterschiede hinsichtlich der HA-Synthese in beiden Kompartimenten (innerhalb und außerhalb der eFZ) nachweisbar.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Dissertation wurde der HA-Stoffwechsel von Stromafibroblasten um BZK in unterschiedlichen Kompartimenten des Mittelgesichts untersucht. Von insgesamt 28 in der Universitätshautklinik Leipzig operierten BZK-Patienten wurden FB aus Tumor-nahem und Tumor-fernem (Referenz-)Gewebe isoliert. Die Probenentnahme erfolgte zur einen Hälfte bei Patienten mit Tumor innerhalb der eFZ und zur anderen Hälfte bei Patienten mit Tumor außerhalb der eFZ (an der Schläfe, Stirn, Augenbraue, Oberlippe und auf der Wange). Die entsprechenden FB wurden in Kultur genommen und *in vitro* hinsichtlich ihres HA-Stoffwechsels analysiert. Die Charakterisierung der unterschiedlichen Hautproben erfolgte durch verschiedene Methoden. Die HA-Verteilung im Gewebe wurde immunhistochemisch visualisiert und die Menge der in den Kulturüberstand freigesetzten HA quantitativ durch einen HA-ELISA bestimmt. Mit Hilfe eines „Westernblot“ konnten die Größen der gebildeten HA-Polymere ermittelt werden. Die Expression der HA-metabolisierenden Enzyme von Stromafibroblasten und deren Reaktion auf aus der Literatur bekannte HA-Stimulatoren wurden mittels quantitativer Realtime PCR gemessen. Die durchgeführten Stimulationsversuche sollten klären, ob TGF- β_1 und PDGF-BB als BZK-Mediatoren zur Induktion der HA-Synthese in Frage kommen (siehe 1.3.3, Abbildung 5). Dabei wurde der stimulierende Effekt zwischen tumornahen und tumorfernen FB innerhalb und außerhalb der eFZ verglichen.

Bekannt ist, dass BZK im Nasen-Mund-Bereich nicht nur gehäuft auftreten sondern vor allem durch ein massives Tiefenwachstum in dieser Zone charakterisiert sind ^{37, 40, 41-43}. Als mögliche Ursache für das verstärkt invasive Wachstum von BZK innerhalb der eFZ wurden Änderungen im HA-Stoffwechsel der Stromazellen angenommen. Unmittelbar nach der Entdeckung von HA 1934 ging man noch davon aus, dass das im Glaskörper von Rinderaugen detektierte Glykosaminoglykan hauptsächlich in dessen biophysikalische Prozesse integriert war ⁵⁸. Durch vielfältige Untersuchungen an dynamischen Zellsystemen um 1970 wurde die essentielle Rolle von HA für jegliche Form von Zellproliferation und Zellmigration aufgedeckt ⁵⁸. Im Zuge der Embryonalentwicklung ermöglicht und erleichtert HA Zellwanderungs- und Zelldifferenzierungsprozesse durch die Bildung einer hydrierten Mikroumgebung ⁵⁸. Auch postnatal ist HA an komplexen Stoffwechselprozessen wie zum Beispiel der Wundregeneration beteiligt ⁸². Eine Fülle von Arbeiten hat in den letzten Jahren verdeutlicht, dass HA-Zellinteraktionen neben physiologischen Prozessen eine bedeutende Rolle im Rahmen von malignen Zelltransformationen spielen ⁵⁸. Vermehrte HA-Ablagerungen in der Tumorumgebung oder erhöhte HA-Serumkonzentrationen wurden bei

einer Vielzahl von Tumoren als Zeichen einer fortschreitenden Tumorprogression beschrieben⁶²⁻⁶⁵. Während andere Tumorentitäten ausführlich diesbezüglich untersucht wurden, ist bis dato wenig über Tumor-Stroma Interaktionen beim BZK bekannt. Ob Änderungen im HA-Stoffwechsel ebenfalls das zunehmend invasive Wachstum von BZK im Bereich der eFZ erklären und ob tumornahe FB um BZK ähnlich wie bei anderen Tumorentitäten im Zuge der Tumorausbreitung zur verstärkten HA-Synthese angeregt werden (siehe 1.3.3, Abbildung 5) sollte in dieser Studie erörtert werden. Die Analyse der FB erfolgte in zweidimensionalen Monolayerkulturen. Frühere Untersuchungen an FB von Sklerodermiepatienten⁸⁶ und an tumornahen FB von malignen Melanomen⁴⁴ zeigten, dass FB *in vivo*-Eigenschaften in der Zellkultur für eine gewisse Zeit erhalten können. Daher erschien der methodische Ansatz geeignet, eventuelle Unterschiede hinsichtlich der Regulation des HA-Stoffwechsels auch *ex vivo* zu identifizieren.

HA-Verteilung und HA-Konzentration

Dazu wurden zunächst verschiedene Gewebeschnitte innerhalb sowie außerhalb der eFZ mit Hilfe einer speziellen Färbung auf das Vorhandensein von HA untersucht (siehe 3.1). Der rein optische Vergleich beider Zonen zeigte jedoch kaum Unterschiede hinsichtlich der HA-Verteilung in den exemplarisch untersuchten Geweben. Auch bei der speziellen Betrachtung von tumornahen und tumorfernen Gewebeschnitten fielen keine Differenzen bezüglich der Menge an detektierten HA-Molekülen auf, wobei die genutzte immunhistochemische Methode keine exakten quantitativen Aussagen ermöglicht. Entsprechend unserer Ergebnisse befindet sich HA als wichtiger Bestandteil des Bindegewebes vor allem in der Dermis gesunden Gewebes. Laut einer Studie aus dem Jahr 2003 wurde die höchste HA-Signalstärke vor allem in der Basalmembran-nahen, oberen Dermissschicht (Stratum papillare) registriert, während sich die darunter liegende Bindegewebsschicht (Stratum reticulare) durch HA-BP nur schwach anfärbte⁸³. In Übereinstimmung mit anderen Autoren wurden von uns in der Epidermis gesunder Haut, wie in Abbildung 9d/10d ersichtlich, nur moderate Mengen an HA, detektiert, die vorwiegend interzellulär lokalisiert waren^{64, 83}. Vergleichend wurden die angefertigten BZK-Schnittpräparate hinsichtlich ihres HA-Musters bewertet. Entsprechend unseren Erwartungen wurden dabei auch im Tumor-umliegenden Stroma HA-Akkumulationen detektiert, deren Quantität sich allerdings optisch nicht eindeutig von gesunder Haut abgrenzte. Bei *in vitro* Studien mit V2 Karzinomzellen des Kaninchens korrelierten bereits erhöhte HA-Konzentrationen im peritumoralen Stroma mit einer fortschreitenden Invasivität von Tumorzellen⁶⁶. Weiterhin konnten steigende HA-Werte im

Tumor-umliegenden Stroma von MM, Brust, Kolon und Ovarialkarzinom nachgewiesen werden, die zudem mit einer ungünstigen Überlebensprognose einher gingen^{62, 63, 65, 67}. Werden also ähnlich wie bei anderen Tumoren FB in der unmittelbaren Umgebung von BZK zur HA-Synthese angeregt? Laut Bertheim *et al.* variieren eventuelle HA-Akkumulationen im peritumoralen Stroma abhängig vom den jeweiligen BZK-Subtypen⁸³. Während beim oberflächlichen BZK kaum HA-Ablagerungen im Tumor umgebenden Stroma zu finden waren, konnten beim eher seltenen infiltrativen BZK immense HA-Ansammlungen nachgewiesen werden⁸³. Karvinen *et al.* konnten zeigen, dass HA Akkumulationen im umliegenden Gewebe von BZK in geringerem Ausmaß zu finden waren als bei anderen vergleichbaren Hauttumoren⁶⁴. Um im Rahmen der durchgeführten Studie die Syntheseleistungen der FB aus den einzelnen embryologisch determinierten Kompartimenten hinsichtlich ihrer realen HA-Konzentrationen vergleichen zu können, wurde ein ELISA zur quantitativen HA-Messung von Kulturüberständen durchgeführt (siehe 3.2). Dabei fielen keine Differenzen bezüglich der HA-Konzentrationen zwischen tumornahen und tumorfernen FB auf. FB aus den verglichenen Lokalisationen sezernierten nach Abbildung 11 vergleichbare Mengen an HA. Auch innerhalb sowie außerhalb der eFZ unterschieden sich die detektierten HA-Konzentrationen von tumornahen und tumorfernen FB nicht signifikant (siehe Abb.11). Die Spezifität unserer Messergebnisse ist dabei mit 96,8% nach Herstellerangaben für den ELISA als hinreichend hoch zu bewerten. Die genutzte Sonde (HA-BP) generierte zuvor ein Hyaluronidase-sensitives Signal (Vgl Abb.9a/c, 10a/c). Angesichts dieser Ergebnisse konnten durch uns *in vivo* keine verstärkten Ablagerungen von HA im Tumorstroma von BZK im Vergleich zu gesunder Haut nachgewiesen werden, was durch Analyse von FB-Überständen aus *in vitro* Kulturen bestätigt wurde. Anders als beim MM gibt es *in situ* keine Anzeichen dafür, dass FB aus der Umgebung von BZK dazu animiert werden vermehrt HA zu bilden. Eigene *in vitro* Untersuchungen mit einer im Rahmen dieser Arbeit etablierten BZK-Zelllinie weisen jedoch darauf hin, dass auch diese Tumorzellen lösliche Mediatoren freisetzen, die die HA-Synthese von Fibroblasten stimulieren können (Daten nicht gezeigt). Außerdem gibt es keine Anzeichen auf eine erhöhte HA-Synthese innerhalb der eFZ verglichen mit anderen Kompartimenten des Mittelgesichts.

HA-Molekülgröße

HA ist ein Polymer aus alternierenden Disaccharideinheiten. Es wurden unterschiedliche Molekülgrößen beschrieben, wobei die verschieden langen HA-Ketten spezifische Funktionen im Zellstoffwechsel wahrnehmen. Außerdem ist bereits bekannt, dass das Molekulargewicht

von freiwerdender HA von der entsprechenden HAS-Isoform, die an deren Synthese beteiligt ist, abhängt⁸⁴. In gesunder Haut liegt HA als hochmolekulares Polysaccharid vor⁸⁵. Im Bereich von Entzündungen und Tumorumgebung wird HA durch aktivierte Hyaluronidasen oder Sauerstoffradikale in niedermolekulare Spaltprodukte (sHA) abgebaut⁸⁵. sHA führt zu Aktivierung von dendritischen Zellen und Endothelzellen, weiterhin sind Tumor- und Metastasierungs- unterstützende Eigenschaften von sHA bekannt⁸⁵. Unsere Größenanalyse der HA-Moleküle innerhalb und außerhalb der eFZ ergab jedoch keine Unterschiede bezüglich der Molekülgröße der *in vitro* sezernierten HA (siehe 3.3). Tumor umliegende FB beider Lokalisationen produzieren ungeachtet ihrer Herkunft HA-Moleküle mit vergleichbarem Molekulargewicht, das etwas unter dem des Healon-Standards (3.500.000-4.100.000 Da, ungefähre Angaben nach Körner *et al.*, 1985) lag.

HA-Enzymexpression

HA unterliegt einem stetigen Umsatz durch HA-Synthetasen und Hyaluronidasen^{54, 55}. Es sind drei HA-synthetisierende Enzyme beschrieben (HAS1, 2, 3)⁵⁴. Am Beispiel des MM konnte gezeigt werden, dass die HA-Synthetase HAS2 das konstitutiv exprimierte Hauptenzym in FB ist (persönliche Mitteilung Anja Willenberg). Vor allem während der Embryonalentwicklung gilt diese Synthetase als unentbehrlich (siehe 1.3.2). HAS1 wird in unstimulierten Fibroblasten nach 2D-Kultur typischerweise nicht exprimiert, wurde aber zum Beispiel durch Melanomzell-Mediatoren *de novo* induziert (persönliche Mitteilung Anja Willenberg). HA-Akkumulationen können zum einen durch eine verstärkte HA-Synthese durch HA-Synthetasen und zum anderen durch einen reduzierten Abbau durch HA-degradierende Enzyme bedingt sein. Letzteres wird durch Änderungen in der Menge oder Aktivität der Hyaluronidasen HYAL1, 2, 3 hervorgerufen⁵⁵. Trotz umfangreicher Untersuchungen liegt bezüglich der Regulation des HA-Metabolismus noch vieles im Ungewissen. Bei unseren Untersuchungen der am HA-Stoffwechsel beteiligten Enzyme von BZK-assoziierten FB unterschieden sich FB innerhalb und außerhalb der eFZ nach kurzer *in vitro* Kultur (eine FB-Passage) nicht hinsichtlich ihrer HA-Enzymausstattung auf mRNA-Ebene (siehe 3.4 Abbildung 13). Die Expression von HAS2- und HYAL2 mRNA war ungeachtet des Ursprungs der Zellen vergleichbar. Die beobachtete erhöhte Expression von HYAL1 mRNA außerhalb der eFZ ist dabei eventuell der sehr großflächigen Definition dieser Zone geschuldet, die zu heterogenen Messwerten bei noch zu geringer Stichprobenzahl führte. Da sich die Größen der HA-Polymere zwischen eFZ und aeFZ nicht unterschieden, interpretieren wir die Daten so, dass sich die beobachteten stärkeren Expressionen der

HYAL1 nicht in einem verstärktem Abbau der HA-Polymere widerspiegeln. Dies kann in reprimierter Translation, verminderter RNA Stabilität oder auch verminderter Aktivität des Enzyms begründet sein. Auch zwischen tumornahen und tumorfernen FB ließen sich mit Ausnahme der HYAL1 Daten keine Unterschiede hinsichtlich der HA-Enzymexpression nachweisen. Die gesteigerte HYAL1-Expression in FB der Referenzproben innerhalb der eFZ wirkte sich jedoch ebenfalls nicht signifikant auf Menge (Abb.11) und Qualität (Abb. 12) der sezernierten HA aus. HAS1/3 sowie HYAL3 konnten in unstimulierten FB der ersten Generation nicht ausreichend detektiert werden und spielen in Übereinstimmung mit anderen Autoren keine wesentliche Rolle für den HA-Stoffwechsel unstimulierter FB in 2D Kulturen. Die erhobenen mRNA-Daten lassen bezüglich des HA-Stoffwechsels keine Unterschiede zwischen den untersuchten FB erwarten. Da auch die resultierenden HA-Mengen im Kulturüberstand vergleichbar waren, gehen wir davon aus, dass sich auch die hier nicht untersuchten Enzymaktivitäten der Synthetasen und Hyaluronidasen nicht deutlich unterscheiden sollten. Wenn dies doch der Fall wäre, dann hätten die Effekte in der Summe zum selben Ergebnis geführt, wie auch die Befunde aus den untersuchten Gewebsschnitten nahe legen. Anders verhielt es sich bei der Untersuchung von FB, die längere Kultivierungsphasen (zwei FB-Passagen) aufwiesen (siehe 3.4 Abbildung 14). Dabei zeichnete sich ein generell erhöhter Turnover des HA-Stoffwechsels in FB außerhalb der eFZ ab, was anhand gesteigerter HAS2 und HYAL1-/ 2-Expressionen deutlich wurde. Dennoch konnten sowohl mit Hilfe des t-Test als auch mittels MWRS-Test keine signifikanten Veränderungen des HA-Stoffwechsels innerhalb sowie außerhalb der eFZ detektiert werden. Dieses erste Anzeichen, das Unterschiede bezüglich des HA-Stoffwechsels innerhalb und außerhalb der eFZ andeutet, könnte auf unterschiedliche Weise interpretiert werden. Zum einen könnte man davon ausgehen, dass aufgrund längerer Kultivierungszeiten von FB *in vivo*-Prozesse nicht mehr wahrheitsgetreu abgebildet werden können. Aus diesem Grund bevorzugten wir im Rahmen unserer Untersuchung eine frühe Analyse der FB, um möglichst nah an der *in vivo* Situation zu bleiben. Die Stimulationsversuche wurden ausschließlich wegen des Erreichens einer definierten Zellzahl erst in der zweiten Passage durchgeführt. Zudem wurde beobachtet, dass zunehmende Konfluenz der Fibroblasten bzw. längere Kulturzeiten nach vorherigem Medienwechsel mit einer niedrigeren HAS-Expression korrelieren (persönliche Mitteilung Sibylle Vorberg). Für den beobachteten erhöhten Turnover des HA-Stoffwechsels in FB außerhalb der eFZ gibt es bis dato noch keine hinreichenden Erklärungen. Weitere Untersuchungen könnten aber prüfen, ob wichtige Signalkaskaden z.B. bei der Regulation von HAS2 (MAPK-Weg⁵⁰) in den Zellen

unterschiedliche Aktivitäten aufweisen. Zudem können HOX-Gene Fibroblasten aus einzelnen Kompartimenten definieren⁸⁷. Auch hier gibt es jedoch keine konkreten Untersuchungen an unseren Zellen.

Stimulation der HA-Synthese durch ausgewählte Mediatoren

Wachstumsfaktoren spielen nicht nur während der Embryonalentwicklung und Wundregeneration sondern auch im Zuge der Tumordinvasion eine zentrale Rolle. PDGF-BB wurde bereits als Stimulator der HA-Synthese beschrieben⁴⁸⁻⁵⁰. Es vermittelt seine zellulären Effekte über die Aktivierung von α - und β -Tyrosinkinase-Rezeptoren und führt zu einer dreifach erhöhten Expression von HAS2 mRNA⁵⁰. Auch HAS1 und HYAL1 mRNA werden nach Li L *et al.*⁵⁰ durch PDGF-BB verstärkt exprimiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von exogener HA die PDGF- β -Rezeptor Aktivierung negativ beeinflussen⁸⁸. Der Einfluss von TGF- β auf die HA-Synthese wird zum Teil kontrovers diskutiert. Bei einigen Autoren gilt TGF- β als potenter Induktor von HAS1 mRNA⁸⁹ & persönliche Mitteilung Anja Willenberg. Andere verweisen ausschließlich auf die Stimulation der HYAL-Aktivität durch TGF- β ⁵⁰. Im Rahmen der von uns durchgeführten Stimulationsversuche zeigte sich nur PDGF-BB als Induktor von HAS2, vor allem in tumorfernem Gewebe. Die Wirkung von TGF- β_1 auf die HA-Enzymexpression war dagegen vernachlässigbar gering. Tumornah fiel die stimulierende Wirkung beider Wachstumsfaktoren ebenfalls minimal aus. So zeigten FB aus der unmittelbaren Tumorumgebung weder infolge einer TGF- β_1 -Stimulation noch nach einer PDGF-BB-Stimulation Änderungen ihrer Syntheseraten für HAS2 mRNA. Tumorfibroblasten innerhalb und außerhalb der eFZ wiesen unterschiedliche basale Konzentrationen von HAS2 sowie HYAL1, 2 zu Gunsten des aeFZ-Kompartiments auf, die eigentliche Stimulation zeigte sich allerdings nahezu unbeeinflusst. Diesbezüglich lassen sich mit Hilfe dieser Arbeit keine Hinweise dafür finden, dass TGF- β_1 und PDGF-BB die HA-Synthese der Tumor-umliegenden FB differentiell beeinflussen. In diesem Sinne sollte über andere mögliche Mediatoren, die in den HA-Stoffwechsel von Tumorfibroblasten eingreifen, nachgedacht werden. In einer Arbeit aus dem Jahre 2007 wies der Wachstumsfaktor EGF ebenfalls nur sehr geringe Wirkungen hinsichtlich der HA-Synthese auf⁵⁰ während bFGF in selbiger Studie keinerlei regulatorischen Einfluss auf die HA-Enzym Expression zeigte⁵⁰. Eine Möglichkeit die Versuchsbedingungen zu optimieren bestände darin, selbige Versuche in FKS- freien Kultivierungsmedium durchzuführen, da FKS selbst eine Reihe von Wachstumsfaktoren enthält, die die Ergebnisse der eigentlichen Stimulation verfälschen könnten. So verwendeten auch Heldin P *et al.*, im Rahmen ihrer Studie über die

Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die HA-Synthese von FB, ausschließlich Medium das nur 0,5 % FKS enthielt ⁴⁸. Dennoch sollten sich bestimmte Tendenzen hinsichtlich der Stimulierbarkeit von FB auch in FKS-haltigem Serum nachweisen lassen. Li L *et al.* ⁵⁰ nahmen für entsprechende Stimulationsversuche nicht nur FKS armes Medium (DMEM + 0,1 % FKS) sondern inkubierten die untersuchten FB für deutlich längere Zeiten (bis 24 h) mit TGF- β sowie PDGF-BB ⁵⁰. Die ohnehin sehr hohe basale Expression von HAS2 in dermalen FB zeigte erst nach 4stündiger PDGF-BB-Stimulation eine 3fach verstärkte HAS2 Enzymexpression ⁵⁰. Angesichts dessen wären eventuell auch längere Inkubationszeiten zu testen. Die von uns gewählten Expositionszeiten beruhen auf Vorversuchen, die zeigten, dass lösliche Mediatoren von Melanomzellen in Fibroblasten bereits nach 3stündiger Exposition zur signifikanten Induktion von HAS1 und HAS2 mRNA führen.

Fazit

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen des HA-Stoffwechsels tumorassoziierter FB kaum Erklärungen für ein verstärkt invasives Wachstum von BZK innerhalb der eFZ. Die Daten zur HA-Verteilung im Gewebe, des HA-Gehalts im Kulturüberstand, der HA-Molekülgröße sowie der genaueren Analyse der exprimierten Enzyme des HA-Stoffwechsels und potentieller HA-Stimulatoren lieferten keine Anhaltspunkte dafür, dass die Regulation des HA-Stoffwechsels in den Stromazellen mit einem verstärkt invasiven Wachstum von BZK innerhalb der eFZ assoziiert sein könnte. Über Gründe warum BZK dennoch in der eFZ durch ein verstärktes Tiefenwachstum auffallen, kann bis zum heutigen Zeitraum nur spekuliert werden. Dennoch müssen potentielle Einschränkungen in der Interpretation der Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit berücksichtigt werden. Untersuchungen an *in vitro* Zellkulturen können trotz exakter Arbeitsweise niemals physiologische Zellprozesse eins zu eins abbilden. Außerdem unterschieden sich die entsprechenden Gewebeproben hinsichtlich ihrer absoluten Größe. Daraus resultierten stark variierende Kultivierungszeiten bis zum Erreichen einer festgelegten Zelldichte der daraus isolierten FB. Zudem wird inhaltlich über die Existenz und die genaue Lokalisation der eFZ nach wie vor kontrovers diskutiert. Newmann und Leffel definieren diese aus der Gesichtsentwicklung hervorgegangene Zone als fest begrenztes Kompartiment ausmessbarer Oberfläche (siehe 1.2.3; Abbildung 3) ³⁹. Andere Autoren umschreiben sie dagegen als vertikal orientierte zwei-dimensionale Fläche ⁹⁰. Wentzell hinterfragt in diesem Sinne berechtigt, ob die genaue Lokalisation und Form der Verschmelzungszone zum einen von allen Befürwortern gleich verstanden wird und zum anderen bisher überhaupt validiert untersucht wurde ⁹⁰. Er selbst beschreibt sie als eine

fortlaufende virtuelle Linie, die sich von der „medialen Lidspalte“ ausgehend bis hin zur „Mundöffnung“ vollstreckt und beklagt diesbezüglich die von Newmann und Leffel vollzogene Unterteilung der eigentlichen Fusionszone in vier separate Untereinheiten⁹⁰. Nach Wentzell weisen diese Fragmente weder eine wirkliche Beziehung zur eigentlichen Verschmelzungszone auf, noch würden sie diese komplett repräsentieren⁹⁰. Im Jahre 1990 versuchten Wentzell und Robinson erstmalig die Anwesenheit der eFZ mit Hilfe von mikroskopischen Schnitten zu widerlegen⁹¹. Wie die unterschiedlichen Positionen bezüglich des Einflusses der eFZ auf die Tumorproliferation verdeutlichen, gibt es in dieser Hinsicht sicherlich noch ausreichend Bedarf für weitere wissenschaftlich fundierte Untersuchungen. Wie bereits erwähnt scheint im HA-Stoffwechsel nicht die alleinige Ursache für das verstärkt invasive Wachstum von BZK innerhalb der eFZ zu liegen. Weiterhin unterscheidet sich das BZK auch hinsichtlich der Tumor-Stroma Interaktionen von anderen Hauttumoren wie dem MM. Mit Hilfe dieser Arbeit konnten keine Anzeichen dafür gefunden werden, dass HA-Stoffwechselprozesse in Tumor-umliegenden FB unter dem Einfluss von BZK-Tumorzellen modifiziert werden. Mögliche Ursachen warum sich BZK so offensichtlich von anderen Hauttumoren unterscheiden, könnte man in den verschiedenen Tumorursprungsgeweben vermuten. BZK gehen als einzige Tumorentität von komplett undifferenzierten Keratinozyten aus. Ebenso unterstreicht die sehr geringe Metastasierungsrate die Sonderstellung von BZK in Formenkreis der malignen Hauttumore. Laut Karvinen *et al.* differierten HA sowie CD44 Expression von BZK deutlich von anderen nichtmelanozytären Tumoren wie dem Plattenepithelkarzinom oder dem Carcinoma in situ⁶⁴. Ähnlich dem unterscheiden sich auch MM und BZK hinsichtlich ihres histopathologischen Ursprungs sowie ihrer Fähigkeit zur Metastasenbildung. Dennoch zeigen BZK stark destruktive Invasionsmuster.

Eine sichere und vollständige Exzision von BZK ist in diesem Sinne die wichtigste Voraussetzung für einen Therapieerfolg. Die im Nasen-Mund-Bereich häufig invasiv wachsenden BZK stellen diesbezüglich eine besondere Herausforderung dar. Bis dato ist die Entwicklung von Medikamenten, die mit Hilfe der umfangreichen Kenntnisse über den HA-Stoffwechsel die großflächige Ausbreitung von epithelialen Hauttumoren verhindern sollen, von besonderer Bedeutung. Als Angriffspunkte der Anti-Krebs Therapie gelten dabei zum einen der in Tumorzellen häufig hochregulierte CD44 Rezeptor sowie das in der Tumormatrix überexprimierte Polymer HA⁹². Beide, CD44 auf Krebszellen sowie HA in der Matrix von Tumoren können über die Konjugation mit entsprechend wirksamen Medikamenten zur gezielten Anreicherung von Krebstherapeutika im Bereich des Tumors führen⁹². In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Plattenepithelkarzinom am Kopf und Hals

nach einer Behandlung mit Anti-CD44 Konjugaten stabile Krankheitsverläufe aufwiesen^{93,94}. Bivatuzumab nennt sich der humane monoklonale Antikörper, der gegen CD44v6 gerichtet und mit dem potenten Toxin Mertansin verbunden ist^{93,94}. Da BZK im Bereich der eFZ aber nicht durch einen verstärkten HA-Stoffwechsel charakterisiert sind, kann derzeit auf entsprechende Therapeutika verzichtet werden. Die histologisch kontrollierte Chirurgie scheint somit auch weiterhin der Goldstandard in der Therapie von vor allem aggressiven BZK zu sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Basalzellkarzinom ist eines der häufigsten semimaligen Tumore der kaukasischen Bevölkerungsgruppe. Bekannt ist, dass BZK in einer definierten Zone des Nasen-Mund-Bereiches, der sogenannten embryonalen Fusionszone, gehäuft in Erscheinung treten. Die eFZ entsteht im Zuge der Embryonalentwicklung aus der Verschmelzung der fünf Gesichtswülste und ist neben einer erhöhten Inzidenz auch durch ein massives Tiefenwachstum von BZK charakterisiert. Als mögliche Ursache für das verstärkt invasive Wachstum von BZK innerhalb der eFZ wurden Änderungen im HA-Stoffwechsel der Stromazellen angenommen. Neben der Bedeutung in der Embryonalentwicklung und bei der Geweberegeneration zeigten verschiedene Arbeiten zudem die essentielle Rolle von HA im Rahmen von malignen Zelltransformationen. Vermehrte HA-Ablagerungen in der Tumorumgebung oder erhöhte HA-Serumkonzentrationen wurden bei einer Vielzahl von Tumoren als Zeichen einer fortschreitenden Tumorprogression beschrieben. In der vorliegenden Dissertation wurde die Hypothese untersucht, ob die sogenannte eFZ durch einen modifizierten HA-Stoffwechsel charakterisiert ist und damit die Ursache für das verstärkt invasive Wachstum von BZK in diesem Kompartiment darstellt. Darüber hinaus ergab sich die Frage, ob der HA-Stoffwechsel von Stromafibroblasten unter dem Einfluss von BZK-Tumorzellen verändert wird. Dafür wurden tumornah und tumorfern FB von innerhalb und außerhalb der eFZ in Kultur genommen und *in vitro* hinsichtlich ihres HA-Stoffwechsels (Größe der sezernierten HA-Polymere, Menge der in den Kulturüberstand freigesetzten HA sowie ihrer HA-Enzymexpression und deren Reaktion auf aus der Literatur bekannte HA-Stimulatoren) analysiert. Zusammenfassend konnten keine Anzeichen dafür gefunden werden, dass ein modifizierter HA-Stoffwechsel für die erhöhte Inzidenz und das verstärkt aggressive Wachstumsverhalten von BZK innerhalb der eFZ verantwortlich ist. Beim Vergleich von Stromafibroblasten um BZK innerhalb und außerhalb der eFZ nach Newman *et al.* konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Menge und Qualität der gebildeten HA nachgewiesen werden. Außerdem war sowohl die Enzymausstattung der Tumor assoziierten FB beider Lokalisationen als auch deren Reaktion auf Tumor stimulierende Mediatoren vergleichbar. Die *in vivo* Untersuchungen und die ermittelten *in vitro* Daten verdeutlichten ebenfalls, dass HA in beiden Kompartimenten ähnlich metabolisiert wird. Für den erhöhten Turnover des HA-Stoffwechsels in FB außerhalb der eFZ gab es bis dato noch keine hinreichenden Erklärungen. Mit Hilfe dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass HA-Stoffwechselprozesse in Tumor-umliegenden FB nicht allein unter dem Einfluss von BZK-Tumorzellen reguliert werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD et al. Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. *Arch Dermatol* 1995; **131**: 157-63.
- (2) Miller SJ. Biology of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 1991; **24**: 1-13.
- (3) Kricger A, English DR, Randell PL et al. Skin cancer in Geraldton, Western Australia: a survey of incidence and prevalence. *Med J Aust* 1990; **152**: 399-407.
- (4) Ting PT, Kasper R, Arlette JP. Metastatic basal cell carcinoma: report of two cases and literature review. *J Cutan Med Surg* 2005; **9**: 10-5.
- (5) Pons M, Quintanilla M. Molecular biology of malignant melanoma and other cutaneous tumors. *Clin Transl Oncol* 2006; **8**: 466-74.
- (6) Osterlind A, Hjalgrim H, Kulinsky B, Frenzt G. Skin cancer as a cause of death in Denmark. *Br J Dermatol*. 1991;**125**: 580-2.
- (7) de Vries E, van de Poll-Franse LV, Louwman WJ, de Gruijl FR, Coebergh JW. Predictions of skin cancer incidence in the Netherlands up to 2015. *Br J Dermatol* 2005; **152**: 481-488.
- (8) Karagas MR, Greenberg RE. Unresolved issues in the epidemiology of basal cell and squamous cell skin cancer. In: *Skin Cancer. Mechanism and Human Relevance*, Boca Raton: CRC Press, 1995: 79-86.
- (9) Greiner R. Skin Cancer: New Markers for Better Prevention. *Pathobiology* 2009; **76**: 64-81.
- (10) Owen DM, Watt FM. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 444-451.
- (11) Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol* 2002; **147**: 41-47.
- (12) Reifenberger J. Basalzellkarzinom: Molekulare Genetik und ungewöhnliche klinische Manifestationen. *Der Hautarzt* 2007; **58**: 406-411.
- (13) Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2007; **157**: 47-51.
- (14) Green A, Battistutta D, Hart V, Leslie D, Weedon D. Skin cancer in a subtropical Australian population: incidence and lack of association with occupation. The Namour Study Group. *Am J Epidemiol* 1996; **144**: 1034-40.
- (15) Kandamany N. Basal cell carcinoma presenting late in a shotgun scar. *Am J Clin Dermatol* 2009; **10**: 271-2.

- (16) Baykal C, Buyukbabani N, Yazganoglu KD, Saglik E. Tumors associated with nevus sebaceous. *J Dtsch Dermatol Ges* 2006; **4**: 28-31.
- (17) Karagas MR, Stukel TA, Morris JS et al. Skin cancer risk in relation to toenail arsenic concentrations in a US population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 2001; **153**: 559-65.
- (18) Brewer JD, Colegio OR, Phillips PK. Incidence of and risk factors for skin cancer after heart transplant. *Arch Dermatol* 2009; **145**: 1391-6.
- (19) Eugene DW, Joshi KD. Xeroderma pigmentosa-a disfiguring disease. *Kathmandu Univ Med J* 2006; **4**: 78-81.
- (20) García de Marcos JA, Dean-Ferrer A, Arroyo Rodríguez S, Calderón-Polanco J, Alamillos Granados FJ, Poblet E. Basal cell nevus syndrome: clinical and genetic diagnosis. *Oral Maxillofac Surg* 2009; **13**: 225-30.
- (21) Asuquo ME, Ngim O, Ebughe G, Bassey EE. Skin cancers amongst four Nigerian albinos. *Int J Dermatol* 2009; **48**: 636-8.
- (22) Breuninger H, Sebastian G, Kortmann RD, Schwipper V, Werner J, Garbe C. Deutsche Leitlinie: Basalzellkarzinom. In: Garbe C, HRSRG. Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2005: 1–11.
- (23) Albrecht J, Hadshiew I, Hembold P, Mrowietz U, Müller L, Schmid-Grendelmeier P, Prinz-Vavricka M, Pittelkow M, Weichenthal M. Basalzellkarzinom. In: Meves A, HRSRG. Intensivkurs Dermatologie. München: Urban&Fischer Verlag, 2006 (1.Auflage): 330-332.
- (24) Stockfleth E, Sterry W. New treatment modalities for basal cell carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2002; **160**: 259-68.
- (25) Breuninger H, Konz B, Burg G. Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie bei malignen Hauttumoren. *Dtsch Arztlblatt* 2007; **104**: A427-32.
- (26) Lawrence CM. Mohs' micrographic surgery for basal cell carcinoma. *Clin Exp Dermatol* 1999; **24**: 130-3.
- (27) Do D. Mohs micrographic surgery for Basal cell carcinoma of the face. *Arch Dermatol* 2009; **145**: 1428-30.
- (28) Gareau DS, Karen JK, Dusza SW, Tudisco M, Nehal KS, Rajadhyaksha M. Sensitivity and specificity for detecting basal cell carcinomas in Mohs excisions with confocal fluorescence mosaicing microscopy. *J Biomed Opt.* 2009; **14**: 034012.
- (29) Petres J, Rompel R. Histographisch kontrollierte Chirurgie In: Operative Dermatologie. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 1996: 48-49.
- (30) Bannister LH, Williams PL. Gray's anatomy. New York: Churchill Livingstone; 1995: 271-88.

- (31) Baume LJ. Die Entwicklungsmechanik des Mittelgesichts in embryogenetischer Sicht. Dtsch Zahn Mund Kieferheilk. 1962: **38**: 1-18.
- (32) Rother P, Wendler D. Entwicklung von Gesicht, Nasen- und Mundhöhle. In: Embryologie des Menschen. Leipzig, Magdeburg: Verlag Wissenschaftliche Scripten, 2004 (5.Auflage): 70-71.
- (33) Moore KL. Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen. Stuttgart, New York: Schattauer, 1990 (4.Auflage): 238-39.
- (34) Höckel M, Horn LC, Fritsch H. Association between the mesenchymal compartment of uterovaginal organogenesis and local tumour spread in stage IB-IIB cervical carcinoma: a prospective study. Lancet Oncol 2005: **6**: 751-6.
- (35) Einenkel J, Vinokurova S, Ziegert C, Horn L-C, von Knebel Doeberitz M, Hockel M. Occult local tumor spread in cervical cancer patients. Int J Gynecol Cancer 2004: **14**: 35.
- (36) Höckel M. Neue Konzepte für die operative Therapie des Zervixkarzinoms. Der Pathologe 2005: **26**: 276-282.
- (37) Granström G, Aldenborg F, Jeppsson PH. Influence of embryonal fusion lines for recurrence of basal cell carcinoma in head and neck. Otolaryngol Head Neck Surg 1986: **95**: 76-82.
- (38) Collison DW, 2002. Persönliche Mitteilung an Newman und Leffell in ³⁹.
- (39) Newman JC, Leffell DJ. Correlation of embryonic fusion planes with the anatomical distribution of basal cell carcinoma. Dermatol Surg 2007: **33**: 957-64.
- (40) Mohs FE, Lathrop TG. Modes of spread of cancer of skin. AMA Arch Derm Syphilol 1952: **66**: 427-39.
- (41) Mora RG, Robins P. Basal-cell carcinomas in the center of the face: special diagnostic, prognostic, and therapeutic considerations. J Dermatol Surg Oncol 1978: **4**: 315-21.
- (42) Panje WR, Ceilley RI. The influence of embryology of the mid-face on the spread of epithelial malignancies. Laryngoscope 1979: **89**: 1914-20.
- (43) Levine H, Bailin P, Wood B, Tucker H. Tissue conservation in treatment of cutaneous neoplasms of the head and neck. Combined use of Mohs' chemosurgical and conventional surgical techniques. Arch Otolaryngol 1979: **105**: 140-4.
- (44) Wandel E, Graßhoff A, Mittag M, Haustein UF, Saalbach A. Fibroblasts surrounding melanoma express elevated levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. Exp Dermatol 2000: **9**: 34-41.
- (45) Anderegg, U., Breitschwerdt, K., Köhler MJ, Sticherling, M., Haustein UF, Simon JC and Saalbach A. MEL4B3, a novel mRNA is induced in skin tumors and regulated by TGF-beta and pro-inflammatory cytokines. Exp Dermatol 2005: **14**: 709-18.

- (46) Löffek S, Zigrino P, Angel P, Anwald B, Krieg T, Mauch C. High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1alpha and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms. *J Invest Dermatol* 2005; **124**: 638-43.
- (47) Stuhlmeier KM, Pallaschek C. Differential effect of transforming growth factor beta (TGF-beta) on the genes encoding hyaluronan synthases and utilization of the p38 MAPK pathway in TGF-beta-induced hyaluronan synthase 1 activation. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 8753-60.
- (48) Heldin P, Laurent TC, Heldin CH. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J*. 1989; **258**: 919-22.
- (49) Yu J, Moon A, Kim HR. Both platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-alpha and PDGFR-beta promote murine fibroblast cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **282**: 697-700.
- (50) Li L, Asteriou T, Bernert B, Heldin CH, Heldin P. Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB. *Biochem J*. 2007; **404**: 327-36.
- (51) Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 2002; **3**: 35-43.
- (52) Wandel E, Raschke A, Hildebrandt G et al. Fibroblasts enhance the invasive capacity of melanoma cells in vitro *Arch. Dermatol Res* 2002; **293**: 601-8.
- (53) Prehm P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem J* 1984; **220**: 597-600.
- (54) Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*. 1997; **272**: 13997-4000.
- (55) Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 2003; **13**: 105-115.
- (56) Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*. 2006; **85**: 699-715.
- (57) Heldin P, Karousou E, Bernert B, Porsch H, Nishitsuka K, Skandalis SS. Importance of hyaluronan-CD44 interactions in inflammation and tumorigenesis. *Connect Tissue Res* 2008; **49**: 215-8.
- (58) Toole BP. Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation. In: Hay E, HRSR. *Cell Biology of Extracellular Matrix*, New York: Plenum Press, 1991: 305-341.
- (59) Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T et al. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest*. 2000; **106**: 349-60.

- (60) Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression *Nat Rev Cancer*. 2002; **2**: 442-54.
- (61) Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 548-58.
- (62) Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjänen KJ. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2000; **60**: 150-5.
- (63) Auvinen PK, Parkkinen JJ, Johansson RT et al. Expression of hyaluronan in benign and malignant breast lesions. *Int J Cancer* 1997; **74**: 477-481.
- (64) Karvinen S, Kosma VM, Tammi MI, Tammi R. Hyaluronan, CD44 and versican in epidermal keratinocyte tumours. *Br J Dermatol* 2003; **148**: 86-94.
- (65) Ropponen K, Tammi M, Parkkinen J et al. Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; **58**: 342-7.
- (66) Toole BP, Biswas C, Gross J. Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; **76**: 6299-303.
- (67) Dietrich A, Tanczos E, Vanscheidt W, Schöpf E, Simon JC. High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 926-30.
- (68) Burchardt ER, Hein R, Bosserhoff AK. Laminin, hyaluronan, tenascin-C and type VI collagen levels in sera from patients with malignant melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2003; **28**: 515-20.
- (69) Herrlich P, Morrison H, Sleeman J et al. CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **910**: 106-118.
- (70) Morrison H, Sherman LS, Legg J et al. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev* 2001; **15**: 968-980.
- (71) Ahrens T, Assmann V, Fieber C. CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. *J Invest Dermatol* 2001; **116**: 93-101.
- (72) Gebhardt C, Aeverbeck M, Viertel A et al. Ultraviolet-B irradiation enhances melanoma cell motility via induction of autocrine interleukin 8 secretion. *Exp Dermatol*. 2007; **16**: 636-43.
- (73) Simon JC, Heider KH, Dietrich A et al. Expression of CD44 isoforms in human skin cancer. *Eur J Cancer*. 1996; **32A**: 1394-400.
- (74) Li Y, Heldin P. Hyaluronan production increases the malignant properties of mesothelioma cells. *Br J Cancer*. 2001; **85**: 600-7.

- (75) Jacobson A, Rahmanian M, Rubin K, Heldin P. Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affect the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors. *Int J Cancer*. 2002; **102**: 212-9.
- (76) Heldin P, de la Torre M, Ytterberg D, Bergh J. Differential synthesis and binding of hyaluronan by human breast cancer cell lines: Relationship to hormone receptor status. *Oncology Rep* 1996; **3**: 1011-1016.
- (77) Xu XM, Chen Y, Chen J et al. A peptide with three hyaluronan binding motifs inhibits tumor growth and induces apoptosis. *Cancer Res* 2003; **63**: 5685-5690.
- (78) Zeng C, Toole BP, Kinney SD, Kuo JW, Stamenkovic I. Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers. *Int J Cancer*. 1998; **77**: 396-401.
- (79) Mohapatra S, Yang X, Wright JA, Turley EA, Greenberg AH. Soluble hyaluronan receptor RHAMM induces mitotic arrest by suppressing Cdc2 and cyclin B1 expression. *J Exp Med*. 1996; **183**: 1663-8.
- (80) Yu Q, Toole BP, Stamenkovic I. Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function. *J Exp Med*. 1997; **186**: 1985-96.
- (81) Ducale AE, Ward SI, Dechert T, Yager DR. Regulation of hyaluronan synthase-2 expression in human intestinal mesenchymal cells: mechanisms of interleukin-1beta-mediated induction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; **289**: 462-70.
- (82) Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen*. 1999; **7**: 79-89.
- (83) Berthel U, Hofer PA, Engström-Laurent A, Hellström S. The stromal reaction in basal cell carcinomas. A prerequisite for tumour progression and treatment strategy. *Br J Plast Surg*. 2004; **57**: 429-39.
- (84) Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem*. 1999; **274**: 25085-92.
- (85) Voelcker V, Gebhardt C, Averbeck M, Saalbach A, Wolf V, Weih F et al. Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4. *Exp Dermatol*. 2008; **17**: 100-7.
- (86) Mauch C, Kozłowska E, Eckes B, Krieg T. Altered regulation of collagen metabolism in scleroderma fibroblasts grown within three-dimensional collagen gels. *Exp Dermatol*. 1992; **1**: 185-90.
- (87) Parsonage G, Filer AD, Haworth O et al. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol*. 2005; **26**: 150-6.
- (88) Li L, Heldin CH, Heldin P. Inhibition of platelet-derived growth factor-BB-induced receptor activation and fibroblast migration by hyaluronan activation of CD44. *J Biol Chem*. 2006; **281**: 26512-9.

- (89) Meran S, Thomas D, Stephens P et al. Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype. *J Biol Chem.* 2007; **282**: 25687-97.
- (90) Wentzell JM. Embryologic fusion planes: A plea for more precise analysis. *Dermatol Surg* 2008; **34**: 851-853.
- (91) Wentzell JM, Robinson JK. Embryologic fusion planes and the spread of cutaneous carcinoma: a review and reassessment. *J Dermatol Surg Oncol.* 1990; **16**: 1000-6.
- (92) Platt VM, Szoka FC Jr. Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Mol Pharm.* 2008; **5**: 474-86.
- (93) Tijink BM, Buter J, de Bree R et al. A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus. *Clin Cancer Res.* 2006; **12**: 6064-72.
- (94) Sauter A, Kloft C, Gronau S et al. Pharmacokinetics, immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine, a novel CD44v6-targeting immunoconjugate, in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Oncol.* 2007; **30**: 927-35.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Prinzip der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie: 3D-Histologie.	4
Abb. 2	Entwicklung des Mittelgesichts durch die Verschmelzung der 5 Gesichtswülste am 24.Embryonaltag.	5
Abb. 3	Die embryonale Fusionszone.	7
Abb. 4	Verteilung von 859 BZK im Mittelgesicht.	8
Abb. 5	Hypothese zu den Mechanismen der Induktion der HA-Synthese im Stroma von Basalzellkarzinomen	12
Abb. 6	Übersicht des angewendeten experimentellen Ablaufs.....	23
Abb. 7	Exemplarische Darstellung einer Eichgeraden nach Amplifizierung des Gens HYAL1.....	29
Abb. 8	Exemplarische Darstellung einer Schmelzkurve, bei der der Schmelzpunkt der Primerdimere bei 75° C, die der spezifischen PCR-Produkte bei 83° C lag.	30
Abb. 9	HA-Färbungen mit HA-BP von Gewebe innerhalb der eFZ.	34f
Abb. 10	HA-Färbungen mit HA-BP von Gewebe innerhalb der aeFZ.....	35
Abb. 11	HA-ELISA der Kulturüberstände von primären Fibroblasten der 1.Passage nach Lokalisation der Probebiopsie.....	37
Abb. 12	Bestimmung der HA-Molekülgröße mittels biotinyliertem HA-BP.....	38
Abb. 13	Realtime qPCR-Daten zur Genexpression der HA-Stoffwechsellzyme HAS2, HYAL1/2 in Fibroblasten der ersten Passage aus den jeweiligen Ursprungsregionen.	39
Abb. 14	Realtime qPCR-Daten zur Genexpression der HA-Stoffwechsellzyme HAS2, HYAL1/2 in Fibroblasten der zweiten Passage aus den jeweiligen Ursprungsregionen.	40
Abb. 15	Induktion der Genexpression von HAS2, HYAL1/2 innerhalb der embryonalen Fusionszone durch TGF-β1 und PDGF-BB mittels Realtime qPCR.....	41
Abb. 16	Induktion der Genexpression von HAS2, HYAL1/2 außerhalb der embryonalen Fusionszone durch TGF-β1und PDGF-BB mittels Realtime qPCR.....	42

Abb. 17 Induktion der Genexpression von HAS2, HYAL1/2 innerhalb und außerhalb der embryonalen Fusionszone durch TGF- β 1 und PDGF-BB mittels Realtime qPCR.
.....43

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Subtypen des BZK.	2
Tab. 2	Primer für die quantitative Real-time PCR.	20
Tab. 3	Verwendete Immunreagenzien.....	21
Tab. 4	20µl Ansatz für cDNA-Synthesereaktion.	26
Tab. 5	Plasmidspezifische Verdünnungsreihen.....	28
Tab. 6	Primerspezifische Annealing und Fluoreszenzdetektions-Temperaturen.	28

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

Danksagung

Für die Möglichkeit in der Forschungsgruppe der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig zu promovieren sowie für die Bereitstellung der entsprechenden materiellen Voraussetzungen danke ich dem Direktor der Klinik Herrn Prof. Dr. med. J. C. Simon.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. habil U. Anderegg unter dessen Anleitung die vorliegende Arbeit entstand. Ich möchte mich vor allem herzlich für die Zuweisung dieses interessanten Themas, die erwiesene geduldige Unterstützung bei dessen Bearbeitung sowie für die umfangreichen Hilfestellungen bei der Durchsicht meiner Dissertationsschrift bedanken.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Forschungsgruppe für die freundliche Aufnahme, ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Hervorheben möchte ich dabei Diplombiologin A. Willenberg, die mir bei allen fachlichen Fragen stets unterstützend zur Seite stand. Besonderer Dank gebührt auch der Medizinisch-Technischen-Assistentin S. Vorberg, die mich geduldig anlernte und deren hilfreiche Betreuung erheblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat.

Dem OP-Team unter Leitung der Oberärzte Dr. med. T. Wetzig und Dr. med. J. Maschke danke ich für die regelmäßige Zuweisung der Patientenproben.

Darüber hinaus gebührt meinem Freund Gregor Hoffmann in jeder Hinsicht großer Dank, vor allem für seine inhaltliche, formale aber auch für seine persönliche Unterstützung.

Besonders möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen lieben Eltern Gunhild und Jürgen Kratzsch bedanken, die mir nicht nur das Medizinstudium und damit auch meine Promotion ermöglichten sondern mir auch in jeglicher Beziehung immer hilfreich zur Seite standen. Vor allem meinem Vater möchte ich für seine erwiesene Hilfe meinen Dank aussprechen.

Nicht vergessen möchte ich meine Schwester Dorothea Kratzsch, bei der ich mich für die verständnisvollen Gespräche und Diskussionen, aus denen ich stets viel Kraft schöpfte, bedanken möchte.

Die Dissertation wurde vom IZKF (Verbund 3/TP2) gefördert, wofür ich sehr dankbar bin.