

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Jochen Bauer

aus: Karlsruhe

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Rolle niedermolekularer Hyaluronsäurefragmente und LYVE-1 bei der Lymphangiogenese

Gutachter: Prof. Dr. Jonathan Sleeman

Prof. Dr. Ilse Hofmann

Zusammenfassung:

Lymphangiogenese ist die Neubildung lymphatischer Gefäße aus bereits bestehenden. Im adulten Organismus findet Lymphangiogenese nahezu ausschließlich während pathologischer Prozesse statt. Im Tumorkontext korreliert eine Neubildung lymphatischer Gefäße häufig mit erhöhter Metastasierung und einer schlechten Prognose für den Patienten. Im Gegensatz dazu kann ein Mangel an funktionellen Lymphgefäßen zu Lymphödemen führen. Lymphangiogenese kontrolliert zu manipulieren ist deshalb ein vielversprechender Ansatz bei der Entwicklung neuer Therapien für verschiedene Krankheitsbilder.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fragmente der Extrazellulären Matrix-Komponente Hyaluronsäure als neue lymphangiogene Faktoren identifiziert. Diese niedermolekularen Hyaluronsäure (sHA)-Moleküle kommen in gesundem Gewebe nur in geringen Mengen vor, bei Entzündungsreaktionen oder im Tumorkontext kann es allerdings zu einer Akkumulation kommen. Die stark bioaktive sHA verfügt über pro-inflammatorische und pro-angiogene Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sHA einen größen- und konzentrationsabhängigen biphasischen Effekt auf die Proliferation primärer humaner Lymphendothelzellen (LECs) vermittelt, während kleinere Fragmente eine stärkere pro-proliferative Wirkung als größere sHA-Moleküle besitzen. Die pro-lymphangiogene Wirkung von sHA wird über den lymphatischen Marker LYVE-1 vermittelt, der in stark sialisierter Form auf den LECs exprimiert wird. Hohe sHA-Konzentrationen hingegen inhibierten die Proliferation, Migration und Gefäßbildung von LECs *in vitro*. Neben einer morphologischen Veränderung der LECs induzierten hohe sHA-Konzentrationen zusätzlich eine TGF- β -unabhängige Herunterregulierung der lymphatischen Marker LYVE-1, Prox-1 und VEGFR-3. Zur Untersuchung der möglichen Rolle von sHA und seinem Rezeptor LYVE-1 in der Tumormetastasierung wurde das murine 4T1-Brusttumormodell verwendet und sowohl in Wildtyp- als auch in LYVE-1 defizienten Tieren getestet. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl das Tumorwachstum als auch die Metastasierung in die Lunge von LYVE-1 unabhängig war. Allerdings war die Metastasierung in die Lymphknoten in den LYVE-1 defizienten Tieren bei identischen sHA-Konzentrationen in der interstitiellen Flüssigkeit der Primärtumore signifikant beeinträchtigt. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit niedermolekularen Fragmenten von Hyaluronsäure neue lymphangiogene Faktoren beschrieben wurden, die konzentrations- und größenabhängig die Funktion und Identität von LECs auf mehreren Ebenen beeinflussen.

Abstract

Lymphangiogenesis is defined as the formation of new lymphatic vessels from preexisting ones. In Adults, lymphangiogenesis is nearly completely restricted to pathological conditions. In the context of tumors, the formation of new lymphatic vessels often correlates with increased metastasis formation and a poor prognosis for cancer patients. In contrast, a lack of functional lymphatic vessels can lead to the formation of lymphedema. Thus, a controlled manipulation of lymphangiogenesis represents a promising approach in the treatment of various pathological disorders.

In the present work, fragments of the extracellular matrix component Hyaluronic Acid were identified as new lymphangiogenic factors. These low-molecular weight Hyaluronic Acid molecules (sHA) occur only in very low concentrations in healthy tissues, whereas during inflammation and tumor growth, an accumulation of sHA can take place. sHA is highly bioactive and possesses pro-inflammatory and pro-angiogenic properties. In the present work, it has been shown, that sHA mediates a size- and dose-dependent biphasic effect on the proliferation of primary human lymphatic endothelial cells (LECs), while small sHA molecules had a stronger pro-proliferative effect than bigger HA-fragments. The pro-lymphangiogenic impact of sHA is mediated via the lymphatic marker LYVE-1, which is expressed on the surface of the LECs in a highly sialylated manner. In contrast, high sHA concentrations inhibit *in vitro* the proliferation, migration and tubule formation of LECs. Additionally to a morphological alteration from an epithelial to a fibroblast-like phenotype, high sHA concentrations induced, by a TGF- β independent way, the downregulation of the lymphatic marker LYVE-1, Prox-1 and VEGFR-3 in LECs. To investigate the putative role of sHA and its receptor LYVE-1 in tumor metastasis, murine 4T1 breast cancer cells were implanted into wildtype- and LYVE-1^{-/-} mice. Thereby, it has been demonstrated that tumor growth and lung metastasis were independent of LYVE-1. However, despite having detected the same amounts of sHA in the interstitial fluid of the primary tumors of wildtype and LYVE-1^{-/-} mice, lymph node metastasis in the LYVE-1 deficient mice were significantly affected. In summary, fragments of Hyaluronic Acid have been described as new lymphangiogenic factors which influence the function and identity of LECs in a size- and dose-dependent manner at various levels.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Lymphatisches System	1
1.1.1 Aufbau und Funktion des Lymphgefäßsystems	1
1.2 Molekulare Regulation der Lymphangiogenese	2
1.2.1 Lymphangiogene Faktoren	2
1.3 Lymphangiogenese in Entwicklung und pathologischen Prozessen	5
1.3.1 Embryonale Lymphvaskulogenese und Lymphangiogenese	5
1.3.2 Lymphangiogenese in Entzündungsreaktionen	7
1.3.3 Lymphödeme	7
1.4 Metastasierung und Tumor-induzierte Lymphangiogenese	9
1.4.1 Metastasierung	10
1.4.2 Tumor-induzierte Lymphangiogenese	10
1.5 Inhibierung der Lymphangiogenese in der Krebstherapie	13
1.6 Hyaluronsäure	14
1.6.1 Chemischer Aufbau von Hyaluronsäure	15
1.6.2 Physiologische Funktion von Hyaluronsäure	15
1.6.3 Stoffwechsel von Hyaluronsäure	16
1.6.4. Hyaluronsäurerezeptoren	20
1.6.4.1 CD44	20
1.6.4.2 TLR-4	21

1.6.4.3	LYVE-1	21
1.7.	Hyaluronsäurefragmente	24
1.7.1	sHA induziert Angiogenese	24
1.7.2	sHA aktiviert das Immunsystem	25
1.7.3	sHA induziert die Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMPs)	26
1.7.4	sHA im Tumorkontext	26
1.7.5	sHA-vermittelte Signaltransduktion	27
1.8	Ziele dieser Arbeit	28
2	Material und Methoden	30
2.1	Material	30
2.1.1	Chemikalien	30
2.1.2	Zellkulturchemikalien	31
2.1.3	Zellkulturmedien	32
2.1.4	Antikörper und Lektine	32
2.1.5	Enzyme	35
2.1.6	Zytokine und Inhibitoren	35
2.1.7	Primer	36
2.1.8	Kits	36
2.1.9	Geräte und Verbrauchsmaterial	36
2.1.10	Puffer und Lösungen	38
2.1.11	Zelllinien	39
2.1.12	Mäusestämme	39
2.2	Methoden	40
2.2.1	DNA-Methoden	40
2.2.1.1	Bestimmung des Genotyps von Balb/c.129S1-Lyve-1 ^{tm1Lhua} /J-Mäusen	40

2.2.1.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	40
2.2.1.1.2	Genotypisierung von Mäusen mittels PCR	40
2.2.1.1.3	Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese	41
2.2.2	Protein-Methoden	41
2.2.2.1	Herstellen von Zellysaten zur Proteinanalyse	41
2.2.2.2	Vorbereiten der Proben für Gelelektrophorese	42
2.2.2.3	SDS-PAGE	42
2.2.2.4	Western Blot	43
2.2.2.5	Strippen von Western Blot-Membranen	44
2.2.2.6	Immunpräzipitation zur Untersuchung des Sialisierungsstatus von LYVE-1	44
2.2.2.7	Lektin-Pull-down Assay	45
2.2.2.8	FACS	45
2.2.2.9	Immunfluoreszenz	46
2.2.3	Methoden zur Produktion und Analyse von Zuckermolekülen	47
2.2.3.1	Verdau hochmolekularer Hyaluronsäure	47
2.2.3.2	Auftrennung von Hyaluronsäurefragmenten mittels Gelchromatographie	47
2.2.3.3	Bestimmen der Hyaluronsäurekonzentration in gesammelten Fraktionen	48
2.2.3.4	Bestimmung der Größe von Zuckermolekülen mittels FACE-Analyse	48
2.2.3.5	Bestimmen der Hyaluronsäurekonzentration in murinen Tumoren	49
2.2.3.6	Aufbereitung der Hyaluronsäurefragmente für den experimentellen Einsatz	49
2.2.4	Zellkultur	49
2.2.4.1	Passagieren von Zellen	49
2.2.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	50
2.2.4.3	Bestimmen der Zellzahl	50

2.2.5	Zellkulturexperimente zur Funktionsanalyse von sHA im Prozess der Lymphangiogenese	50
2.2.5.1	³ H-Thymidininkorporationsassay	50
2.2.5.2	Migrationsassay	51
2.2.5.3	Gefäßbildung auf Matrigel	52
2.2.5.4	Untersuchung der durch sHA in LECs induzierten Signalwege	52
2.2.5.5	Untersuchung der Wirkung von sHA und TGF-β auf die Expression lymphatischer Marker	52
2.2.6	Tumorexperimente	53
2.2.6.1	Injektion von murinen 4T1-Tumorzellen und Entnahme von Organen	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Untersuchung der Wirkung von sHA auf LECs <i>in vitro</i>	54
3.1.1	Herstellung und Analyse von Hyaluronsäurefragmenten (sHA)	54
3.1.2	sHA vermittelt einen biphasischen Effekt auf die Proliferation von LECs	55
3.1.3	sHA hemmt die Migration von LECs <i>in vitro</i>	57
3.1.4	sHA inhibiert die Gefäßbildung von LECs konzentrationsabhängig	58
3.1.5	Hohe sHA-Konzentrationen induzieren einen G1-Arrest in LECs	59
3.1.6	sHA vermittelt einen additiven Effekt mit VEGF-C und FGF-2	60
3.2	Identifizierung und Charakterisierung des Rezeptors für sHA auf humanen LECs	61
3.2.1	CD44, TLR-4 und LYVE-1 werden auf der Oberfläche von LECs exprimiert	61
3.2.2	LYVE-1 vermittelt den pro-proliferativen Effekt von sHA	62
3.2.3	Analyse des Sialisierungsstatus von LYVE-1	63
3.2.4	Auf LECs kann LYVE-1 nicht als Corezeptor für PDGFβRs fungieren	65

3.3	Untersuchung der molekularen Wirkungsweise niedriger sHA-Konzentrationen	66
3.3.1	Der pro-proliferative Effekt von sHA ist unabhängig von IL-6	66
3.3.2	Identifizierung der von sHA in LECs regulierten Signalwege	68
3.4	Untersuchung der Wirkungsmechanismen hoher sHA-Konzentrationen	71
3.4.1	Der anti-proliferative Effekt von sHA wird durch TGF- β vermittelt	71
3.4.2	TGF- β induziert eine Herunterregulierung lymphatischer Marker in LECs	72
3.4.3	Hohe sHA-Konzentrationen führen zu einem Verlust der Expression lymphatischer Marker	75
3.5	Untersuchung der Relevanz von LYVE-1 im Tumorkontext	77
3.5.1	Kreuzung der B6.129S1-Lyve1 ^{tm1Lhua} /Mäuse auf einen genetischen Balb/c-Hintergrund	78
3.5.2	Injektion von murinen 4T1-Brustkrebszellen in LYVE-1-KO-Mäuse	78
4	Diskussion	81
4.1	Bestätigung der pro-proliferativen Eigenschaften von sHA <i>in vitro</i> durch eine sHA-vermittelte Lymphangiogenese <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i>	81
4.2	Vergleich der Effekte von sHA auf die Proliferation, Migration und Gefäßbildung von LECs und BECs	82
4.3	LYVE-1 als Rezeptor von sHA	83
4.4	LYVE-1 fungiert nicht als Corezeptor von PDGF β R auf primären LECs	85
4.5	Die molekulare Wirkungsweise niedriger sHA-Konzentrationen	86
4.6	Die Wirkungsweise hoher sHA-Konzentrationen	89
4.7	LYVE-1 im Kontext sHA-produzierender Tumore	94
4.8	sHA in der lymphangiogenen Therapie	96

Literaturverzeichnis	99
Abbildungsverzeichnis	120
Abkürzungsverzeichnis	122
Danksagung	125

1. Einleitung

1.1 Lymphatisches System

1.1.1 Aufbau und Funktion des Lymphgefäßsystems

Alle Wirbeltiere verfügen über ein Lymphgefäßsystem, das in seiner Komplexität variiert und mit Ausnahme des Gehirns und der Retina in nahezu allen Organen vorhanden ist (Albrecht und Christofori, 2011).

Das Lymphgefäßsystem erfüllt eine ganze Reihe von physiologischen Funktionen. Innerhalb eines Tages werden beim Menschen bis zu zwei Liter interstitielle Flüssigkeit vom lymphatischen System zurück in die Blutzirkulation geschleust, um die Homöostase im Organismus aufrechtzuerhalten. Zusätzlich werden Abfallprodukte aus Geweben und Organen abtransportiert. Das lymphatische System spielt auch eine zentrale Rolle in der Immunabwehr. Pathogene und Immunzellen können zu Lymphknoten, die innerhalb des Systems als Filterstationen fungieren, transportiert werden. Dort kommt es dann zur Initiation einer Immunantwort. Schließlich unterstützt das Lymphsystem den Transport von Nahrungsfetten vom Darm in die Leber (Albrecht und Christofori, 2011).

Die feinsten Verzweigungen des Lymphgefäßsystems bilden die blind-endenden Lymphkapillaren, die hauptsächlich für die Aufnahme von Stoffen, Zellen und Flüssigkeiten zuständig sind. Ihre Gefäßwand ist einschichtig und besitzt keine Basalmembran. Die Zellen sind dort über relativ lose Zell-Zellkontakte miteinander verbunden, die hauptsächlich aus den Adhäsions- und Tight-junction-Proteinen VE-Cadherin, Occludin und Claudin-5 aufgebaut sind (Baluk et al., 2007). Die Lymphkapillaren münden über Vorsammelgefäße in die Hauptsammelgefäße des Lymphgefäßsystems, die über eine Schicht glatter Muskelzellen verfügen. Die Lymphendothelzellen (LECs) sind hier enger miteinander verbunden, was auf eine veränderte Organisation von VE-Cadherin, Occludin und Claudin-5 zurückzuführen ist. Zusätzlich verfügen diese Zellen über eine Basalmembran (Baluk et al., 2007). Der unidirektionale Fluss der Lymphe von der Peripherie zurück in die Blutzirkulation wird durch Klappen in den Sammelgefäßen ermöglicht. Die antreibende Kraft für den Fluss der Lymphe sind die Kontraktionen der glatten Muskelzellen, der Skelettmuskulatur und Atembewegungen (Albrecht und Christofori, 2011). Die Lymphe wird über den *Ductus Thoracicus* und den rechten Lymphgang in die Venen der Nackenregion zurück in die Blutzirkulation befördert.

1.2. Molekulare Regulation der Lymphangiogenese

Lymphangiogenese wird als die Neubildung von Lymphgefäßen aus bereits bestehenden definiert. Dieser Prozess unterliegt dabei einer komplexen molekularen Regulation. Faktoren, die die Lymphangiogenese fördern, werden hierbei als pro-lymphangiogen, hemmende Moleküle als anti-lymphangiogen bezeichnet

1.2.1 Lymphangiogene Faktoren

Wachstumsfaktoren aus der VEGF (Vascular endothelial growth factor)-Familie besitzen eine herausragende Rolle in der Steuerung und Regulation der Lymphangiogenese. Der pro-lymphangiogene Faktor VEGF-C (Vascular endothelial growth factor)-C stellt dabei das zentrale Molekül in der Regulation dieses Prozesses dar. VEGF-C vermittelt seine Wirkung über die Bindung an die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor)-2 und VEGFR-3, die auf Blut- und Lymphgefäßen exprimiert werden. Durch post-translationale Prozessierungen wird die Affinität von VEGF-C schrittweise von einer starken Bindung zu VEGFR-2 zu einer erhöhten Bindungsaffinität zu VEGFR-3 verändert (Joukov et al., 1997). Eine Überexpression von VEGF-C in muriner Haut führt zu einer Proliferation und Vergrößerung lymphatischer Gefäße, wobei Blutgefäße nicht betroffen sind (Jeltsch et al., 1997). Eine Überexpression von VEGF-C in Tumorzellen korreliert mit einer erhöhten tumoralen Lymphgefäßdichte, einem erhöhten Lymphfluss, einer verstärkten Metastasierung in Lymphknoten und anderen Organen und stellt einen wichtigen prognostischen Faktor in der Krebstherapie dar (Kinoshita et al., 2001; Skobe et al., 2001; Su et al., 2006). Diese Effekte können durch die Inhibierung des VEGFR-3-Signalweges und Verwendung eines blockierenden VEGFR-3-Antikörpers gemindert oder aufgehoben werden (He et al., 2002a; Hoshida et al., 2006). VEGF-C spielt ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des Lymphgefäßsystems, bei entzündlichen Reaktionen und wird bei der Therapie von Lymphödemen erfolgreich eingesetzt (Ristimäki et al., 1998; Karkkainen et al., 2004; Tammela et al., 2007; Kataru et al., 2009; Lähteenvuo et al., 2011).

Neben VEGF-C gibt es weitere Vertreter der VEGF-Familie, die über eine pro-lymphangiogene Wirkung verfügen. So beeinflusst VEGF-A neben der Angiogenese und der Tumorprogression auch Prozesse der Lymphangiogenese. In transgenen Mäusen führte eine Überexpression von VEGF-A zu einer Proliferation VEGFR-2-positiver, tumorassoziierter Lymphgefäße, nodaler Lymphangiogenese und einer verstärkten Metastasierung (Hirakawa et al., 2005). Neben einer Expression in Tumorzellen konnte auch in B-Zellen des

Immunsystems die Expression von VEGF-A festgestellt werden, die zu einer Lymphangiogenese in lokalen Lymphknoten führte und zur Entwicklung von postkapillären Venolen beiträgt (Shrestha et al., 2010). VEGF-D bindet ebenfalls an die Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3 (Achen et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass dieser pro-lymphangiogene Faktor die Bildung neuer Lymphgefäße im Tumorkontext induziert und einen Beitrag zur Metastasierung liefert (Stacker et al., 2001; Lin et al., 2012; Yanagawa et al., 2012). Eine Überexpression von VEGF-D führte im Mausmodell zu einem verstärkten Auftreten von Tumoren und einer deutlich verkürzten Lebensspanne (Kotimaa et al., 2012).

Die zentrale Rolle von VEGF-C in der Lymphangiogenese wird daran deutlich, dass eine Reihe lymphangiogener Faktoren ihre Wirkungen indirekt über eine Hochregulierung von VEGF-C vermitteln. Eine Überexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2), einer Isoform der Prostaglandin H-Synthase, in Brustkrebszellen, führt zu einer verstärkten Expression von VEGF-C. Die Expression von COX-2 korreliert mit der Expression von VEGF-C und der Lymphgefäßdichte in klinischen Proben von Brustkrebspatienten (Su et al., 2004). Das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-17 (IL-17) fördert die Migration und die Ausbildung gefäßartiger Strukturen von LECs. Im Tumormodell konnte eine Korrelation zwischen der Expression von IL-17, VEGF-C und der Lymphgefäßdichte festgestellt werden (Chen et al., 2010). Neben einer Induktion in Tumorzellen gibt es auch lymphangiogene Faktoren, die eine Expression von VEGF-C in Immunzellen bewirken. Erythropoietin (EPO), ein Hormon, das primär an der Entstehung roter Blutkörperchen beteiligt ist, konnte in Mausmodellen mit Brustkrebs- und Melanomzellen die Expression von VEGF-C in Makrophagen induzieren. Dies führte *in vivo* zu einer verstärkten Lymphangiogenese und Metastasierung in den Lymphknoten, *in vitro* stimulierte EPO die Proliferation und Migration von LECs (Lee et al., 2011). Die pro-lymphangiogene Wirkung von FGF-2 wird durch eine Hochregulierung von VEGF-C und -D vermittelt (Chang et al., 2004). Hierbei entscheidet die eingesetzte Konzentration über eine pro-angiogene oder pro-lymphangiogene Wirkung von FGF-2 (Chang et al., 2004). Indirekte Wirkungsweisen lymphangiogener Faktoren können auch unabhängig von VEGF-C sein. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass der pro-lymphangiogene Effekt von Interleukin-7 über die Hochregulierung von VEGF-D vermittelt wird (Al-Rawi et al., 2005).

Eine Reihe von Molekülen beeinflusst direkt den Prozess der Lymphangiogenese durch die Steuerung der Proliferation, Migration und der Ausbildung gefäßartiger Strukturen durch

LECs. Der Wachstumsfaktor PDGF-BB (Platelet-derived growth factor BB) besitzt pro-lymphangiogene Eigenschaften und fungiert als Chemokin für LECs. Durch die Bindung an die Rezeptoren PDGF α R und PDGF β R induziert PDGF-BB *in vitro* und *in vivo* die Lymphangiogenese und fördert die lymphogene Metastasierung (Cao et al., 2004). Die pro-lymphangiogenen Effekte von IGF-1/-2 (Insulin-like growth factor 1/2) und des Wachstumshormons GH (growth hormone) beruhen auf der Induktion der Proliferation, Migration und dem Bilden neuer Gefäßstrukturen von LECs und werden durch eine Blockierung von VEGFR-2 oder VEGFR-3, den Rezeptoren von VEGF-C, nicht beeinflusst (Björndahl et al., 2005; Banziger-Tobler et al., 2008).

Im Gegensatz zur großen Anzahl pro-lymphangiogener Faktoren sind bisher nur wenige endogene Moleküle bekannt, die eine hemmende Wirkung auf die Lymphangiogenese besitzen. Das Zytokin TGF- β , das in den Isoformen TGF- β -1/-2 und -3 vorkommt und wie BMPs (Bone morphogenic proteins) und GDFs (Growth and differentiation factors) zur TGF- β -Superfamilie gezählt wird (Shi und Massagué, 2003; Massagué, 2008), verfügt über anti-lymphangiogene Eigenschaften. In funktionellen Assays konnte gezeigt werden, dass TGF- β zum einen die Proliferation und Migration von LECs hemmt, als auch deren Fähigkeit zur Bildung gefäßartiger Strukturen unterdrückt. Zusätzlich kommt es zu einer Herunterregulierung der lymphatischen Marker LYVE-1 und Prox-1 (Oka et al., 2008). Im Kontext von Lymphödemen konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von TGF- β zu einer gesteigerten Funktion der Lymphgefäße führt und eine einsetzende Lymphangiogenese zu beobachten ist (Avraham et al., 2010a). Im Tumorkontext konnte eine ambivalente Rolle von TGF- β nachgewiesen werden (Xie et al., 2002; Massagué, 2008). In der prämaligen oder frühen Phase der Tumorentwicklung verfügt TGF- β über eine inhibierende Funktion, später jedoch kann dieses Zytokin wichtige Vorgänge unterstützen, die die Tumorprogression und Metastasierung fördern (Biswas et al., 2004; Seton-Rogers et al., 2004; Muñoz et al., 2006; Massagué, 2008). Seine pro-tumorale Wirkung wird hierbei unter anderem durch die Induktion der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) vermittelt (Derynck und Akhurst, 2007). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TGF- β -1 in Blut- und Lymphendothelzellen eine Endotheliale-Mesenchymale-Transition (EndoMT) induzieren kann, die mit einer morphologischen Veränderung der Zellen, einer Herunterregulierung endothelialer bzw. lymphatischer Marker und einer Hochregulierung mesenchymaler Marker einhergehen kann (Zeisberg et al., 2007; Clavin et al., 2008).

Endostatin, ein Fragment von Kollagen XVIII, inhibiert die Proliferation und Migration von LECs konzentrationsabhängig. Dieser Wirkmechanismus erfolgt wahrscheinlich über eine Herunterregulierung von VEGF-C, konnte doch gezeigt werden, dass eine Überexpression von Endostatin zu einer Reduktion von VEGF-C und einer Hemmung der Lymphangiogenese und Lymphknotenmetastasierung führt (Shao und Xie, 2005; Brideau et al., 2007). Dieser inhibitorische Effekt ist offenbar auf proliferative Lymphgefäße beschränkt und beeinflusst die Funktion normaler Lymphgefäße nicht (Zhuo et al., 2010).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bereits eine Reihe pro- und anti-lymphangiogener Faktoren beschrieben wurde. Das Ausmaß der Lymphangiogenese könnte durch eine Änderung des Gleichgewicht zwischen diesen Faktoren bestimmt werden, ähnlich der Regulierung der Angiogenese (Hanahan und Folkman, 1996)

1.3 Lymphangiogenese in Entwicklung und pathologischen Prozessen

Während der Embryonalentwicklung kommt es zur Bildung des Lymphgefäßsystems, ein Prozess, der als embryonale Lymphvaskulogenese bezeichnet wird. Im adulten Organismus findet Lymphangiogenese unter physiologischen Bedingungen nur begrenzt statt. Ausnahmen sind das Endometrium während des Menstruationszyklus und die Wundheilung. Bei verschiedenen pathologischen Prozessen wie Entzündungen oder Krebs kann jedoch eine Neubildung lymphatischer Gefäße beobachtet werden.

1.3.1 Embryonale Lymphvaskulogenese und Lymphangiogenese

Das Lymphgefäßsystem bildet sich während der Embryonalentwicklung erst nachdem sich das Blutgefäßsystem formiert hat (Albrecht und Christofori, 2011). Am anterioren Teil der Kardinalvene kommt es bei einzelnen Zellen zur Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptors (VEGFR)-3, einer transmembranen Rezeptor-Tyrosinkinase, und des lymphatischen Markers LYVE-1 (Albrecht und Christofori, 2011). Durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors Sox-18 wird die Expression des lymphatischen Regulators Prox-1 in diesen Zellen induziert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Sox-18 in Blutendothelzellen (BECs) zu einer Expression lymphatischer Marker führt (François et al., 2008). Neben Sox-18 ist auch HoxD8 an der Induktion und der Aufrechterhaltung der Prox-1-Expression in LECs beteiligt (Harada et al., 2009). Prox-1 stellt das zentrale Gen in der Differenzierung lymphatischer Zellen aus Blutgefäßen dar. Durch die Induktion der Expression lymphatischer Marker wie VEGFR-3 und der Komplexbildung mit dem

Transkriptionsfaktor COUP-TF II ist Prox-1 in der Lage, das Auswandern der ersten Lymphendothelzellen aus den Kardinalvenen zu stimulieren und die Aufrechterhaltung des lymphatischen Charakters dieser Zellen zu gewährleisten (Wigle und Oliver, 1999; Wigle et al., 2002; Lee et al., 2009; Yamazaki et al., 2009).

Nach dem Auswandern der LECs aus der Kardinalvene migrieren diese in das umgebende Gewebe, proliferieren und bilden den sogenannten lymphatischen Plexus. Der prolymphangiogene Faktor VEGF-C, der von umliegenden mesenchymalen Zellen sezerniert wird, stellt das chemotaktische Signal dar, dass eine Ausknospung der Lymphgefäße induziert (Karkkainen et al., 2004). Diese Wirkung von VEGF-C ist stark abhängig von der Expression von VEGFR-3 und dessen Corezeptors Neuropilin-2 (Nrp-2) auf der Oberfläche der LECs (Xu et al., 2010). Das sezernierte Protein CCBE-1 spielt ebenfalls eine Rolle in der embryonalen Lymphangiogenese. Ein Defekt in diesem Gen führt beim Menschen zu einer Dysplasie der Lymphgefäße (Alders et al., 2009; Hogan et al., 2009). Durch die Induktion dieser Vorgänge kommt es zur Bildung erster primitiver Lymphgefäße, die sich nachfolgend von den Blutgefäßen separieren.

LECs exprimieren auf ihrer Oberfläche den lymphatischen Marker Podoplanin, der an den CLEC-2-Rezeptor auf Blutplättchen binden kann. Dadurch kommt es zu einer SYK-, SLP-76- und Phospholipase C γ 2-abhängigen Aktivierung der Blutplättchen. Diese Aktivierung induziert die Trennung von Blut- und Lymphgefäßen. Mutationen in den SYK-, SLP-76- und Phospholipase C γ 2-Genen führen zu blutgefüllten Lymphgefäßen (Ichise et al., 2009; Bertozzi et al., 2010; Carramolino et al., 2010; Uhrin et al., 2010).

Die Reifung lymphatischer Gefäße beinhaltet die Entwicklung des primitiven lymphatischen Plexus in ein hierarchisches Netzwerk von Lymphkapillaren und lymphatischen Sammelgefäßen. Die Transkriptionsfaktoren Foxc2 und NFATc1 sind bei der Rekrutierung von glatten Muskelzellen und Perizyten involviert (Norrmén et al., 2009). Die Bildung von Lymphklappen, die den unidirektionalen Fluss der Lymphe ermöglichen, wird durch eine Interaktion von Integrin- α 9 mit Fibronectin-E111A induziert (Bazigou et al., 2009).

Die embryonale Entwicklung des Lymphgefäßsystems stellt somit ein äußerst komplexer Prozess dar, der noch nicht vollständig entschlüsselt wurde. Durch die Verwendung weiterer Modelorganismen wie den Krallenfrosch oder den Zebrafisch erhofft man sich, neue interessante Erkenntnisse in der Lymphvaskulogenese zu erlangen (Ny et al., 2005, 2006).

1.3.2 Lymphangiogenese in Entzündungsreaktionen

Das lymphatische System ist an der Wundheilung und an Entzündungsreaktionen beteiligt. Pathogene und Zellen können durch Lymphgefäße relativ einfach aufgenommen und zu Lymphknoten abtransportiert werden, wo die Initiierung der Immunantwort stattfindet (Albrecht und Christofori, 2011).

Durch eine Stimulation von LECs mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α kommt es zu einer Sezernierung von CCL-21, was über einen β 2-Integrin-abhängigen Mechanismus zu einer erhöhten Transmigration von dendritischen Zellen in das Lymphgefäßsystem führt (Johnson und Jackson, 2010). Pro-inflammatorische Zytokine sind in der Lage, die Expression von VEGF-C in Fibroblasten und Immunzellen wie dendritischen Zellen und Makrophagen zu induzieren (Ristimäki et al., 1998; Hamrah et al., 2003; Kataru et al., 2009). Eine erhöhte Expression von VEGF-C korreliert in Entzündungen und der Wundheilung mit der Induktion von Lymphangiogenese, einer Erhöhung des lymphatischen Flusses und einer verstärkten Beseitigung von Pathogenen (Saaristo et al., 2006; Kataru et al., 2009; Huggenberger et al., 2011). Durch die Stimulierung mit inflammatorischen Zytokinen konnte eine NF- κ B-abhängige Hochregulierung lymphatischer Marker wie VEGFR-3 und Prox-1 in LECs beobachtet werden. Dies führte zu einer verstärkten Proliferation und Migration dieser Zellen. Zusätzlich kam es, vermittelt durch die stärkere VEGFR-3-Expression, zu einer erhöhten Sensibilität der LECs gegenüber VEGF-C, was zu einer deutlich verstärkten Lymphangiogenese führte (Flister et al., 2010). Eine häufige Folge entzündlicher Reaktionen ist die Bildung von lokalen Schwellungen in Geweben. Eine spezifische Aktivierung von Lymphgefäßen führt zu einer Verminderung dieser Schwellungen und zu einer Begrenzung der entzündlichen Reaktion (Huggenberger et al., 2011). Die Bildung neuer Lymphgefäße basiert primär auf der Proliferation und Migration von LECs. Im Kontext von Entzündungen kann es zusätzlich zu einer Hochregulierung lymphatischer Marker wie LYVE-1 und Prox-1 in Makrophagen führen, was diese dazu befähigt, in bestehende lymphatische Gefäße zu integrieren und somit strukturell die Lymphangiogenese mittels Transdifferenzierung zu unterstützen (Maruyama et al., 2005; Zumsteg et al., 2009).

1.3.3 Lymphödeme

Fehlfunktionen der Lymphgefäße können zu einem Stau der Lymphe in Geweben führen, was zu einem Anschwellen der betroffenen Bereiche führt. Die Ursachen für diese sogenannten

Lymphödeme sind vielschichtig und man unterscheidet generell zwischen primären und sekundären Lymphödemen (Alitalo, 2011).

Primäre Lymphödeme sind Erkrankungen des Lymphsystems, die durch Defekte in Genen hervorgerufen werden, die für die Struktur und Funktionalität des Lymphsystems essentiell sind. Bei der häufigsten Form der primären Lymphödeme, dem Lymphödem-distichiasis, liegt eine Mutation im Gen des Transkriptionsfaktors *Foxc2* vor. Diese führt zu einer fehlerhaften Entwicklung der Lymphklappen, einer mangelnden Ausstattung der Lymphgefäße mit glatten Muskelzellen und Komponenten der Basallamina (Norrmén et al., 2009). Durch eine Mutation im *VEGFR-3*-Gen kommt es zum chronischen Anschwellen von Extremitäten (Karkkainen et al., 2001). Momentan ist die manuelle Lymphdrainage die einzige, meist suboptimale Therapiemöglichkeit. Genetisch bedingte Fehlfunktionen des lymphatischen Systems könnten in Zukunft aber durch Therapien behoben werden, die darauf abzielen, die Funktion des Systems durch Behandlung mit pro-lymphangiogenen Faktoren wie VEGF-C oder VEGF-D wiederherzustellen. Durch die Verabreichung und den genetischen Transfer von VEGF-C konnte in Versuchstieren die Bildung lymphatischer Gefäße angeregt und der Rückgang von Lymphödemen induziert werden (Karkkainen et al., 2001; Norrmén et al., 2011).

Sekundäre Lymphödeme entstehen durch Fehlfunktionen des Lymphgefäßsystems, die durch Verletzungen, operative Eingriffe oder Bestrahlungen verursacht wurden (Alitalo, 2011). Bei Brustkrebspatienten kann nach der operativen Entfernung der axillaren Lymphknoten häufig ein Anschwellen der Arme beobachtet werden, was auf einen deutlich verringerten Abtransport der interstitiellen Flüssigkeit aus dem Gewebe zurückzuführen ist (McLaughlin et al., 2008; Stanton et al., 2009). Momentan ist die manuelle Lymphdrainage auch hier die einzige Therapiemöglichkeit. Die Behandlung dieser Lymphödeme könnte in Zukunft, wie bei den primären Lymphödemen, durch eine Verabreichung von pro-lymphangiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF-C und -D und unter Umständen einer Transplantation von Lymphknoten erfolgen. Bei Schweinen führte eine Gentherapie mit VEGF-C und -D und eine Lymphknotentransplantation zur Neubildung von Lymphgefäßen und Beseitigung der Lymphödeme (Tammela et al., 2007; Lähtenvuo et al., 2011).

Die genauen molekularen Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung von Lymphödemen beitragen, sind noch nicht geklärt. Fibrose spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Lymphödemen. TGF- β , ein Regulator der Fibrose, ist an der Induktion von Lymphödemen

beteiligt (Clavin et al., 2008). Eine Behandlung von LECs mit TGF- β führt zu einer Herunterregulierung lymphatischer Marker wie LYVE-1 und Prox-1. Zusätzlich bewirkt diese Behandlung eine Verringerung der Proliferation und Migration der LECs und inhibiert deren Fähigkeit, gefäßartige Strukturen auszubilden (Clavin et al., 2008; Oka et al., 2008). Erhöhte Konzentrationen von TGF- β konnten in Proben von Patienten mit Lymphödemen nachgewiesen werden (Avraham et al., 2010a). TGF- β ist somit ein zentrales Molekül in der Initiierung und Aufrechterhaltung primärer Lymphödeme, und entsprechend geht seine Inhibierung mit einer Reduktion der Fibrose und gesteigerter Lymphangiogenese und Funktionsfähigkeit der Lymphgefäße einher (Avraham et al., 2010a).

Sowohl bei Entzündungsreaktionen als auch bei Ödemen geht eine erhöhte Lymphgefäßdichte somit mit einer Abschwächung des Krankheitsbildes einher. Eine kontrollierte Stimulation der Lymphangiogenese könnte daher ein therapeutischer Ansatz in diesen pathologischen Prozessen darstellen.

1.4 Metastasierung und Tumor-induzierte Lymphangiogenese

Neben ihrer Rolle in der Embryonalentwicklung, bei Entzündungsreaktionen und Lymphödemen besitzt die Lymphangiogenese eine zentrale Bedeutung bei der Metastasierung.

Neben Herz- und Kreislauferkrankungen stellen Tumorerkrankungen eine der häufigsten Todesursachen in Industrienationen dar (Weltgesundheitsorganisation WHO, 2008). Durch chirurgische Eingriffe und anschließende Therapien können Primärtumore gut entfernt werden. Die größte Gefahr für den Patienten geht allerdings von der Fähigkeit der Tumore aus, sekundäre Geschwülste in entfernten Regionen des Körpers zu bilden (Sleeman und Steeg, 2010). Die Formierung von Metastasen lässt sich nur schwer blockieren und Sekundärtumore können aufgrund ihres oft systemischen Auftretens nur sehr schwer behandelt werden (Gonzalez-Angulo et al., 2007). Von Metastasen befallene Organe erleiden bei fortschreitendem Wachstum des Sekundärtumors einen erheblichen bis vollständigen Funktionsverlust. Dies ist ein Grund dafür, weshalb Metastasen in über 90% für den Tod von Krebspatienten verantwortlich sind (Sporn, 1996).

1.4.1 Metastasierung

Die Verbreitung von metastasierenden Tumorzellen im Organismus kann prinzipiell auf drei Arten erfolgen: durch die direkte Einwanderung von Zellen in benachbarte Körperhöhlen und den Transport über das Blut- und Lymphgefäßsystem (Sleeman et al., 2009).

Der Bildung von Metastasen liegt eine Reihe von molekularen und zellulären Abläufen zugrunde, welche unter dem Begriff der Invasion-Metastasierungs-Kaskade zusammengefasst werden (Valastyan und Weinberg, 2011). Im Allgemeinen lässt sich diese Kaskade in folgende Schritte unterteilen:

- Einwandern von Tumorzellen in umgebendes Gewebe und Durchbrechen der Basalmembran
- Eintritt in das Lymph- und Blutgefäßsystem (Intravasation)
- Überleben des Transports in der Zirkulation
- Verlassen des Gefäßsystems und Einwandern in gesundes Gewebe (Extravasation)
- Anpassung der Tumorzellen an die Bedingungen in der neuen Umgebung und Bildung von Mikrometastasen
- Initiierung eines (pro-)proliferativen Programmes und Formation makroskopischer Metastasen

1.4.2 Tumor-induzierte Lymphangiogenese

Aufgrund des Aufbaus und der Struktur des lymphatischen Systems, das sich unter anderem durch relativ lose Zell-Zellkontakte und das Fehlen einer Basalmembran auszeichnet, können Tumorzellen verhältnismäßig leicht in das lymphatische Gefäßsystem einwandern. Wie bei der Angiogenese können Tumore die Neubildung von Lymphgefäßen fördern (Lymphangiogenese). Diese Lymphangiogenese spielt eine wichtige Rolle bei der Metastasierung (Sleeman et al., 2009; Tammela und Alitalo, 2010; Albrecht und Christofori, 2011).

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Tumore über das lymphatische System metastasieren können und das Auftreten von Lymphangiogenese im Kontext muriner und humaner Tumore oft mit einer schlechten Prognose einhergeht (Karpanen et al., 2001; Mandriota et al., 2001; Skobe et al., 2001; Hoshida et al., 2006; Su et al., 2006).

Tumore sind neben Stromazellen in der Lage, Faktoren zu sezernieren, die die Proliferation und Migration von LECs fördern. Diese tumor-induzierte Lymphangiogenese bewirkt eine erhöhte Lymphgefäßdichte in der Umgebung des Tumors, was invasiven Tumorzellen eine vergrößerte Anzahl an Eintrittsstellen in das lymphatische und somit auch in das Blutgefäßsystem eröffnet. Zusätzlich kommt es durch die erhöhte Gefäßdichte zu einem Anstieg des lymphatischen Flusses in benachbarten Lymphknoten, was dazu führt, dass sich mehr Tumorzellen in der Zirkulation befinden. Durch diese vergrößerte Anzahl zirkulierender Tumorzellen wird die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Metastasierung deutlich erhöht (Alitalo und Carmeliet, 2002; Thiele und Sleeman, 2006; Sleeman und Thiele, 2009; Alitalo, 2011).

In verschiedenen Tierexperimenten und klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression und Sezernierung von VEGF-C zu einer Induktion der Lymphangiogenese führt. Dies bewirkte eine verstärkte Bildung von Metastasen in Lymphknoten und vom Primärtumor entfernten Organen wie der Lunge. Dieser Effekt konnte durch eine Blockade des auf Lymphgefäßen exprimierten Moleküls VEGFR-3, dem Rezeptor von VEGF-C, aufgehoben werden (Karpanen et al., 2001; Skobe et al., 2001; He et al., 2002; Hoshida et al., 2006; Su et al., 2006; Krishnan et al., 2003). Die pro-lymphangiogene Wirkung von VEGF-D, einem Liganden von VEGFR-2 und VEGFR-3, und die damit einhergehende verstärkte Metastasierung konnte ebenfalls durch blockierende Antikörper inhibiert werden (Stacker et al., 2001; Thiele und Sleeman, 2006).

Tumorzellen können sowohl in intra- als auch peritumorale Lymphgefäße einwandern und sich über das Zirkulationssystem in entfernte Körperregionen transportieren lassen. Welche dieser Lymphgefäße einen höheren Beitrag zur Metastasierung liefert, ist jedoch noch unklar (Padera et al., 2002; Kyzas et al., 2005).

Invasive Tumorzellen sind in der Lage, ihre Einwanderung in und durch das lymphatische System durch die Verwendung bereits existierender Mechanismen zu fördern. So konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen Oberflächenrezeptoren exprimieren, die eine wichtige Rolle bei der Wanderung von Immunzellen besitzen und auch bei der Migration von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen. Als Beispiel hierfür dient der CC-Chemokin-Rezeptor-7 (CCR-7), der auf aktivierten dendritischen Zellen exprimiert wird und an der Wanderung dieser Immunzellen über die Lymphgefäße zu regionalen Lymphknoten beteiligt ist. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass CCR-7 auch auf Brust- und

Kolonkarzinomzellen wie auch auf Melanomzellen exprimiert wird und die Expression mit einer schlechten Prognose einhergeht (Wiley et al., 2001; Schimanski et al., 2005). Der Ligand von CCR-7, das Chemokin CCL-21, wird primär von LECs produziert und sezerniert. Es wurde gezeigt, dass VEGF-C die Expression und Sezernierung von CCL-21 in und von LECs stimuliert, was zu einer verstärkten Migration der Tumorzellen in Richtung Lymphgefäße führt (Issa et al., 2009). Durch den durch den unidirektionalen Fluss der Lymphe hergestellten und aufrechterhaltenen CCL-21 Gradienten erfolgt die Migration der Tumorzellen stets vom Primärtumor in Richtung Lymphknoten. Eine Neutralisation von CCL-21 führte zu einer verringerten Metastasierung von murinen Melanomzellen in die Lymphknoten (Wiley et al., 2001).

Durch die Überexpression katabolischer Enzyme in Tumorzellen kann deren Eintritt in das Lymphgefäßsystem erleichtert werden. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des Enzyms Lipoxygenase in Brustkrebszellen zu Defekten in den Wänden von Lymphgefäßen führt. Durch diese erhöhte Permeabilität der Gefäße konnte eine Einwanderung der Tumorzellen in das Lymphgefäßsystem und eine verstärkte Metastasierung beobachtet werden (Kerjaschki et al., 2011).

Die Regulation der tumor-induzierten Lymphangiogenese ist abhängig von vielen verschiedenen Faktoren und sehr komplex. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von VEGF-C zwar zu einer Erhöhung der peritumoralen und intranodalen Lymphangiogenese führte, aber keinen Effekt auf die Metastasierung in der Lunge hatte. Zusätzlich korreliert eine erhöhte Expression von VEGF-C und eine verstärkte Lymphangiogenese nicht zwangsläufig mit einer schlechten Prognose für den Patienten (He et al., 2002; Sedivy et al., 2003; Franchi et al., 2004; Fernández et al., 2008). Dies lässt den Schluss zu, dass es eine Reihe weiterer Moleküle und Mechanismen geben muss, die am Prozess der Lymphangiogenese und der lymphogenen Metastasierung beteiligt sind.

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass im Gegensatz zu ihrer Rolle bei Entzündungsreaktionen und Lymphödemen, eine erhöhte Lymphgefäßdichte im Tumorkontext häufig einen schlechten prognostischen Faktor für den weiteren Krankheitsverlauf darstellt.

1.5 Inhibierung der Lymphangiogenese in der Krebstherapie

Lymphangiogenese spielt eine zentrale Rolle bei der Metastasierung verschiedenster Tumorarten. Durch die Identifizierung lymphangiogener Faktoren gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, den Prozess der tumorinduzierten Lymphangiogenese zu manipulieren und zu kontrollieren.

Ein zentrales Ziel in der anti-lymphangiogenen Krebstherapie stellt die Inhibierung der Wirkung pro-lymphangiogener Faktoren wie VEGF-C und VEGF-D dar. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung des VEGFR-3-Signalweges durch das Abfangen von VEGF-C/-D durch ein lösliches künstlich eingeführtes VEGFR-3-Rezeptorglobulin zu einer Inhibierung der Lymphangiogenese und einer Reduktion der Metastasierung zu regionalen Lymphknoten und anderen Organen führt (Krishnan et al., 2003; He et al., 2005; Lin et al., 2005; Burton et al., 2008). Neben dem Einsatz dieser neutralisierenden Rezeptorglobuline konnte auch der Einsatz von siRNA-basierter Methoden, die zu einer Reduktion des VEGF-C-Levels führten, die Lymphangiogenese und somit die Metastasierung erfolgreich hemmen (Chen et al., 2005). Blieb bei einer einfachen Inhibierung von VEGF-C das Tumorwachstum meist unbeeinflusst, so konnte bei einer kombinierten Therapie mit anti-VEGFR-2- und anti-VEGFR-3-Antikörpern eine Blockade des Tumorwachstums und eine verringerte Metastasierung beobachtet werden. Dies zeigt, dass ein kombinierter Einsatz anti-angiogener und anti-lymphangiogener Faktoren eventuell ein verbesserter Ansatz zu einseitigen Therapieansätzen darstellen kann (Roberts et al., 2006).

Neuropilin-2 (NRP-2) spielt eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung und embryonalen Lymphangiogenese und fungiert als Corezeptor für VEGF-C. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass eine Blockierung von NRP-2 die Bindung von VEGF-C verhindert und zu einer Inhibierung der tumoralen Lymphangiogenese und Metastasierung führt (Caunt et al., 2008). Die pro-lymphangiogene Wirkung von COX-2 erfolgt über die Hochregulierung von VEGF-C (Su et al., 2004). Durch den Einsatz des COX-2-Inhibitors Etodolac in einem orthotopischen Tumormodell kam es zu einer Herunterregulierung von VEGF-C in Makrophagen, was zu einer Inhibierung der Makrophagen-induzierten Lymphangiogenese führte (Iwata et al., 2007). Die pro-lymphangiogene Wirkung von COX-2 wird durch die Verabreichung von Aspirin und gewissen anti-inflammatorischen Agenzien verringert, was eine Verwendung dieser Substanzen in der anti-lymphangiogenen Krebstherapie überlegenswert erscheinen lässt (Yiannakopoulou, 2011).

Durch das chirurgische Entfernen des Primärtumors und betroffener Lymphknoten wird ein Großteil der Tumorzellen aus dem Organismus entfernt. In den vorhandenen Lymphgefäßen können jedoch invasive Tumorzellen zurückbleiben, die in der Lage sind, neue Metastasen zu bilden. Bei Melanom- und Brustkrebszellen wurde die Bildung neuer Metastasen aus diesen zurückgebliebenen Tumorzellen nachgewiesen (Tammela et al., 2011). Mittels photodynamischer Therapie konnte eine Zerstörung Tumor-assoziiierter Lymphgefäße und intralymphatischer Tumorzellen beobachtet werden, was mit einer Blockierung der Metastasierung einherging und die Tiere vor einer erneuten Erkrankung bewahrte (Tammela et al., 2011). Somit konnte gezeigt werden, dass eine post-chirurgische Zerstörung Tumor-assoziiierter Lymphgefäße eine wichtige Rolle in der anti-lymphangiogenen Krebstherapie spielen kann.

Bei all diesen Therapieansätzen müssen jedoch die Nebenwirkungen für den Patienten im Auge gehalten werden. Eine systemische Inhibierung gewisser Moleküle könnte zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, die einen potentiellen Nutzen in der Krebstherapie nebensächlich machen würde. Eine Inhibierung von VEGFR-3 könnte eine Wirkung auf die Wundheilung und die Megakaryopoese besitzen und wäre gerade im Tumorkontext, wo chirurgische Eingriffe und der Einsatz von Zytostatika zur Standardtherapie gehören, von Nachteil (Thiele et al., 2012).

Bei Patienten mit der Gefahr einer neuerlichen Krebserkrankung könnte eine prophylaktische Inhibierung der Lymphangiogenese eine Metastasierung verhindern. Zusätzlich könnte die Hemmung der Tumor-induzierten Lymphangiogenese bei Patienten mit gutartigen Geschwülsten die Gefahr einer im weiteren Krankheitsverlauf möglichen Metastasierung deutlich reduzieren und die Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs reduzieren (Sleeman et al., 2009). Bei bereits existierenden Metastasen wäre eine Hemmung der tumor-induzierten Lymphangiogenese nur von begrenztem Nutzen, könnte dadurch nur die Bildung weiterer Metastasen verhindert, das Wachstum der Sekundärtumore allerdings nicht beeinträchtigt werden.

Durch eine gezielte Regulation der Lymphangiogenese lassen sich somit eine Reihe unterschiedlichster Krankheitsbilder behandeln. Im Rahmen dieser Arbeit wurden niedermolekulare Fragmente der Hyaluronsäure auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den Prozess der Lymphangiogenese zu beeinflussen. Im Folgenden sollen daher nun Hyaluronsäure und ihre Fragmente näher beschrieben werden

1.6 Hyaluronsäure

Im Jahre 1934 isolierten Karl Meyer und John Palmer aus dem Kammerwasser eines Rinderauges ein neues, bis dato unentdecktes hochmolekulares Polysaccharid (Meyer und Palmer, 1934). Aufgrund des von ihnen vermuteten Aufbaus des Polymers aus einer Uronsäure, einem Aminozucker und einer Pentose und des griechischen Wortes für Glas „hyalos“ nannten sie dieses Molekül Hyaluronsäure. Erst 25 Jahre später konnte Meyer zeigen, dass sich Hyaluronsäure aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten (Ds) aus N-Acetylglucosamin und Glucuronsäure zusammensetzt (Meyer, 1958).

1.6.1 Chemischer Aufbau von Hyaluronsäure

Die Arbeit von Meyer konnte mehrfach bestätigt werden und zeigte, dass Hyaluronsäure (HA) ein hochmolekulares, lineares und nicht-sulphatiertes Polysaccharid ist, das sich aus repetitiven über β -1-4- und β -1-3-Bindungen verknüpfte Disaccharideinheiten aus N-Acetylglucosamin und Glucuronsäure zusammensetzt. Das Molekulargewicht dieses Glykosaminoglykans reicht von 3 bis 7×10^6 Dalton (Balazs et al., 1967; Dahl et al., 1985; Laurent und Fraser, 1992). Durch gezielte Anordnung der einzelnen Hyaluronsäureketten können sich doppelhelikale Strukturen ausbilden, die dem HA-Netzwerk eine deutlich höhere strukturelle Festigkeit verleihen (Scott, 1989).

1.6.2 Physiologische Funktion von Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) findet sich in beinahe allen Geweben und bildet einen essentiellen Bestandteil der Extrazellulären Matrix (EZM). Die EZM besteht neben HA aus einer Reihe unterschiedlichster Proteine, Proteoglykane und Polysacchariden mit verschiedenen physikalischen und biochemischen Eigenschaften (Ozbek et al., 2010; Lu et al., 2012). Die EZM dient der Stabilisierung der Zellen und ermöglicht ihnen einen Informationsaustausch mit der Umgebung. Eine Remodulierung oder Fehlbildung der EZM ist an pathologischen Prozessen wie Fibrose und Krebs beteiligt (Zhu et al., 1995; Frantz et al., 2010; Huijbers et al., 2010). Zusätzlich übernimmt die EZM eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung von Nischen-Strukturen und der Zellpolarität (Garcion et al., 2004; Davidson et al., 2006).

Hochmolekulare Hyaluronsäure (HMW-HA) findet sich verstärkt an Oberflächen, an denen starke Reibungskräfte entstehen wie bei Knorpel- oder Muskelgewebe und fungiert dort als eine Art „Schmiermittel“ (Laurent et al., 1991). Durch ihre hohe osmotische Pufferkapazität und ihren Flusswiderstandes ist HA ein idealer Regulator der Homöostase und ermöglicht als

Diffusionsbarriere einen regulierten Transport von Substanzen durch den interzellulären Raum (Day, 1950). HA besitzt ein großes Hydrationsvermögen, bildet Flüssigkeiten mit hoher Viskosität und Elastizität und hat eine platzfüllende, gleitend machende und filternde Funktion inne (Laurent und Fraser, 1992). Neben diesen physikalisch-mechanischen Funktionen, erfüllt HMW-HA eine große Anzahl weiterer Aufgaben. HA kann durch Oxidationsreaktionen und ionisierende Strahlung degradiert werden und könnte somit als eine Art Radikalfänger fungieren und Zellen damit effektiv vor genotoxischen Schäden schützen (Myint et al., 1987). Viele verschiedene Zelltypen umgeben sich mit einem sogenannten perizellulären Mantel, der hohe HMW-HA-Konzentrationen aufweist. Diese Matrix führt zur Bildung wasserangereicherter Räume und erhöht durch die Verringerung der Adhäsion die Migration von Zellen (Evanko et al., 1999). Im Zellkern und dem Zytoplasma von glatten Muskelzellen und Fibroblasten konnte eine erhöhte HA-Konzentration nachgewiesen werden, die in Verbindung mit der Proliferation der Zellen, der Funktion des Nukleolus und der Anordnung der Chromosomen gebracht werden konnte (Evanko und Wight, 1999). In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass eine HA-reiche EZM oft an embryonalen und pathologischen Prozessen durch die Steuerung von Migration und Proliferation beteiligt ist (Toole et al., 2002). Im Tumorkontext konnte gezeigt werden, dass HMW-HA die Migration durch Regulierung der Fibrin-Polymerisation beeinflusst (Hayen et al., 1999).

Der lokale Abbau von HMW-HA kann primär über die enzymatische Aktivität von Hyaluronidasen oder reaktiven Sauerstoffspezies erfolgen.

1.6.3 Stoffwechsel von Hyaluronsäure

Die Halbwertszeit von HMW-HA beträgt im Blut 2-5 Minuten, in der Haut 12 Stunden. Innerhalb eines Tages werden ein Drittel der gesamten im Organismus vorhandenen Hyaluronsäure abgebaut und neu gebildet (Fraser et al., 1981). Somit stellen der Auf- und Abbau von Hyaluronsäure sehr dynamische Prozesse dar.

HMW-HA wird hauptsächlich von Fibroblasten und zu einem geringeren Teil von glatten Muskelzellen gebildet (Laurent et al., 1995). Das Glykosaminoglykan wird dabei durch die Verknüpfung von UDP-Glucuronsäure und UDP-N-Acetylglucosamin auf der Innenseite der Plasmamembran synthetisiert. Die wachsende HA-Kette wird nach erfolgter Synthese über ABC-Transporter an die Zelloberfläche verbracht (Prehm, 1984). Hierbei spielt eine Klasse von Enzymen, die sogenannten Hyaluronsäuresynthasen (HAS), eine zentrale Rolle. Bisher konnten drei verschiedene HAS charakterisiert werden, wobei HAS-1, HAS-2 und HAS-3

zuerst im Bakterium *Streptococcus pyogenes* identifiziert wurden (DeAngelis et al., 1993). Es wird angenommen, dass sich alle HAS-Gene in Vertebraten aus einem gemeinsamen Gen in der Evolution entwickelten. Dies wird durch die enge strukturelle Ähnlichkeit zwischen HAS-2 und HAS-3 deutlich (Spicer und McDonald, 1998). Nach der Transfektion von HAS-1, -2 und -3 in CHO-Zellen konnte beobachtet werden, dass sich diese Enzyme in der Länge der von ihnen jeweils synthetisierten HA-Ketten und der Polymerisationsrate unterscheiden. HAS-3 besaß die höchste Polymerisationsrate und synthetisierte bevorzugt Ketten mit einer Größe von $0,12 \cdot 10^6$ Dalton, während HAS-2 größere ($3,9 \cdot 10^6$ Dalton), und HAS-1 kleinere ($0,12 \cdot 10^6$ Dalton) HA-Ketten bildeten (Brinck und Heldin, 1999). Eine Deletion von HAS-2 während der Embryonalentwicklung führt zu einem Fehlen von HMW-HA, zu verschiedenen Anomalitäten im Herz- und Kreislaufsystem und zum Tod der murinen Embryonen bei Tag 9,5-10 der Embryonalentwicklung (Camenisch et al., 2000). Dies verdeutlicht die überragende Rolle von HMW-HA und die herausragende Bedeutung von HAS-2 in dieser frühen Entwicklung. Eine Relevanz von HMW-HA im Tumorkontext konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Eine Überexpression von HAS-2 geht mit einer verstärkten Motilität und Proliferation von Tumorzellen einher (Ichikawa et al., 1999; Kosaki et al., 1999). Die Syntheserate der HMW-HA kann durch Wachstumsfaktoren wie PDGF-BB, EGF, FGF-2 und TGF- β -1 verstärkt werden (Heldin et al., 1989).

Der Abbau von HMW-HA erfolgt hauptsächlich in den Lymphknoten und der Leber. Dabei extrahieren die Zellen in den Lymphknoten bereits 80-90% der Gesamtmenge an abgebauter HA aus der interstitiellen Flüssigkeit, bevor die HA weiter in den Blutkreislauf gelangt und schließlich in der Leber gänzlich abgebaut wird. Neben Endothelzellen spielen auch Makrophagen eine zentrale Rolle bei diesem Abbau (Fraser und Laurent, 1989). HMW-HA wird von einer Gruppe von Enzymen abgebaut, die als Hyaluronidasen (Hyal) bezeichnet wird. Diese Enzyme lassen sich, basierend auf ihrer Sequenz-Homologie, in drei verschiedene Gruppen einteilen:

- Gruppe 1: HA-4-glycoanohydrolasen: Diese Hyaluronidasen spalten HA durch Hydrolyse an den β -1,4-glykosidischen Bindungen und bilden bevorzugt Tetrasaccharide. Neben HA können sie auch Chondroitin und Chondroitinsulphat spalten. Zu dieser Gruppe gehören die Hyaluronidasen der Säugetiere und einiger Insekten (Stern und Jedrzejewski, 2006).

- Gruppe 2: HA-3-glycoanohydrolasen: Sie spalten HMW-HA an den β -1,3-glykosidischen Bindungen und bilden bevorzugt Tetra- und Hexasaccharide. Zu dieser Gruppe gehören die Hyaluronidasen der meisten Egel und Würmer (Stern und Jedrzejak, 2006).
- Gruppe 3: mikrobielle Hyaluronidasen: Sie spalten HMW-HA nicht hydrolytisch, sondern durch eine β -Eliminierungs-Reaktion (Stern und Jedrzejak, 2006).

Beim Menschen sind sechs verschiedene Gene für Hyaluronidasen bekannt, die auf zwei verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Hyal-1, -2 und -3 befinden sich auf Chromosom 3, Hyal-4, Hyal-P1 und PH-20/SPAM-1 auf Chromosom 7 (Csoka et al., 2001).

Eine hohe Hyal-1-Expression findet sich in Leber, Niere, Milz und dem Herzen. Hyal-1 ist intrazellulär in Lysosomen lokalisiert und in saurem Milieu enzymatisch aktiv (Frost et al., 1997). In Hyal-1-knockout-(KO)-Mäusen konnten, abgesehen von einer erhöhten HA-Konzentration in den Kniegelenken, keine größeren Anomalitäten nachgewiesen werden (Martin et al., 2008). Hyal-2 ist, wie Hyal-1, in Lysosomen lokalisiert und wird über einen GPI-Anker an der Zelloberfläche gebunden. Dieses Enzym generiert an der Oberfläche HA-Fragmente mit einer Größe von 50-60 Disacchariden, die nach der Internalisierung durch lysosomale Hyal-1 zu Tetrasacchariden abgebaut werden (Lepperdinger et al., 1998; Stern, 2004). Somit ist beim Abbau der HA eine Interaktion zwischen Hyal-2 und Hyal-1 zu beobachten. In Hyal-2-KO-Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym für die Aufrechterhaltung der HA-Konzentration im Plasma verantwortlich ist, und die Homöostase von Erythrozyten und Blutplättchen reguliert (Jadin et al., 2008). Im Gegensatz zu Hyal-1 und -2 verfügt Hyal-3 über keine intrinsische Hyaluronidase-Aktivität. Eine mögliche Rolle von Hyal-3 könnte die Regulation der Hyal-1 Aktivität sein (Hemming et al., 2008). Hyal-4 wird spezifisch in der Plazenta und Muskeln exprimiert und spaltet bevorzugt Chondroitinsulphat (Csoka et al., 2001; Kaneiwa et al., 2010). Die mRNA von Hyal-P1 beinhaltet ein Stopcodon, das zu einem verfrühten Abbruch der Translation führt und Hyal-P1 zu einem Pseudogen werden lässt. Die Hyaluronidase PH-20 (SPAM-1) ist ein multifunktionelles Protein, das membrangebunden und in löslicher Form vorkommt. Aufgrund seiner spezifischen Expression auf der Oberfläche von Spermien besitzt diese Hyaluronidase eine zentrale Rolle bei der Penetration des Spermiums durch die HA-reiche Matrix der Oozyte (Cherr et al., 2001). Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Hyaluronidase aus Rinderhoden (BTH) ist eine lösliches Enzym und stellt ein Fragment der PH-20 Hyaluronidase dar (Meyer et al., 1997). Neben der hydrolytischen Spaltung von β -1,4-glykosidischen Bindungen in HA ist

BTH auch in der Lage, Chondroitin, Chondroitinsulphat und Dermatansulphat zu spalten, wobei Tetrasaccharide und gesättigte Disaccharide die Hauptprodukte dieser Hydrolyse darstellen (Takagaki et al., 1994).

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen und Schädigungen in Geweben kann es durch die Aktivität von Hyaluronidasen und ROS zu einem verstärkten Abbau von HMW-HA und somit zu einer Akkumulation von sHA kommen (Moseley et al., 1997; Chajara et al., 2000). Zusätzlich sind Hyaluronidasen durch die Modulation der HA-Konzentration und HA-Größe an der Progression von Tumoren beteiligt. Bei Patienten mit Prostatakrebs oder Blasen Tumoren konnte eine erhöhte Expression von Hyal-1 in Tumorzellen nachgewiesen werden, die einen prognostischen Faktor im weiteren Krankheitsverlauf darstellte (Posey et al., 2003; Aboughalia, 2006). Eine Überexpression von Hyal-2 und PH-20 konnte bei verschiedenen Tumortypen nachgewiesen werden und korrelierte mit einer erhöhten Invasivität der Tumorzellen (Beech et al., 2002; Udabage et al., 2005). Neben einer verstärkten Expression HA-abbauender Enzyme konnte auch ein durch eine Überexpression von HA-Synthasen induzierte Überproduktion von HA das Tumorwachstum im Tiermodell stimulieren (Koyama et al., 2007). Diese Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick widersprüchlich. Hyaluronsäure und Hyaluronidasen könnten jedoch synergistisch das Tumorwachstum fördern, indem sie verschiedene Mechanismen beeinflussen oder zeitlich unterschiedlich wirken. HMW-HA könnte durch ihr starkes Hydrationsvermögen Tumorzellen Platz für deren Proliferation geben und die Diffusion von Nährstoffen erleichtern. Hyaluronidasen könnten später durch den Abbau von HA die Angiogenese und somit das Tumorwachstum fördern. Interessanterweise bewirkte die ektopische Co-Expression von Hyaluronsäuresynthasen und Hyal-1 verglichen mit einer individuellen Überexpression einen deutlichen Anstieg im Tumorwachstum und der Metastasierung (Simpson, 2006; Bharadwaj et al., 2009).

Neben Enzymen können auch freie Radikale am Abbau von HMW-HA und an der Generierung von HA-Fragmenten beteiligt sein. Freie Radikale entstehen unter normalen physiologischen Bedingungen als Abbauprodukte verschiedenster Reaktionen, können aber unter UV-Strahlung, Entzündungen oder oxidativem Stress akkumulieren und dabei Zellen schädigen. HMW-HA dient als eine Art Schutzschild gegen diese reaktiven Oxygenspezies (ROS) und wird dabei in kleinere Fragmente degradiert (Myint et al., 1987). Der Abbau von HMW-HA durch endogene ROS in der *in vitro* Kultur humaner Haut konnte nachgewiesen

werden (Agren et al., 1997). Beim Vergleich zwischen normalen Prostata- und Tumorzelllinien konnte eine erhöhte ROS-Bildung bei den malignen Zellen beobachtet werden. Diese verstärkte Generierung von ROS korreliert mit einem erhöhten Migrations- und Invasionspotential der Tumorzellen (Kumar et al., 2008).

1.6.4 Hyaluronsäurerezeptoren

HMW-HA vermittelt eine Vielzahl seiner Funktionen über spezifische Interaktionen mit anderen Molekülen. Durch die Bindung von HMW-HA an Proteoglykane wie Aggrecan, Versican, Neurocan oder Brevican und die Formierung großer Komplexe kommt es zur Bildung und Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der EZM (Hardingham und Muir, 1972; Margolis und Margolis, 1994). Zusätzlich ist HMW-HA in der Lage mit weiteren Proteinen wie Hyaluronektin, TSG-6, Stabilin und Layilin zu interagieren. Im Folgenden werden diejenigen HA-Rezeptoren näher beschrieben, die im Rahmen dieser Arbeit von größter Bedeutung waren.

1.6.4.1 CD44

Das Oberflächenmolekül CD44, das ursprünglich auf Lymphozyten identifiziert wurde und dort an der Erkennung von hochendothelialen Venolen und dem gezielten Wandern von Lymphozyten beteiligt ist, ist ein weit verbreiteter Rezeptor für HA (Gallatin et al., 2006). CD44 ist an einer Vielzahl von Prozessen in der Embryonalentwicklung, der Ausbildung des Blutgefäßsystems und an der Initiierung von Immunreaktionen beteiligt und spielt eine Rolle bei der Tumorprogression (Ruiz et al., 1995; Naor et al., 2008; Zöller, 2011). Als Transmembranglykoprotein besteht CD44 aus sieben extrazellulären, einer transmembranen und einer cytoplasmatischen Domäne und verfügt über ein berechnetes Molekulargewicht von 37 kDa (Peach et al., 1993). Es gehört zur Cartilage-Link-Protein-Familie und besitzt wie alle Mitglieder ein sogenanntes Link-Modul, das zur Bindung an HA befähigt (Stamenkovic et al., 1989; Banerji et al., 1998). Diese konservierte Protein-Domäne besteht aus zwei antiparallelen β -Blättern und zwei α -Helices, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Kohda et al., 1996), wobei CD44 über ein verlängertes Link-Modul verfügt (Banerji et al., 1998). Durch alternatives Spleißen können verschiedene Isoformen von CD44 hervorgebracht werden, die durch transkriptionelle Modifikationen wie N- und O-Glykosilierungen ihrer extrazellulären Domäne weiter modifiziert werden und über mehr oder weniger spezifische Expressionsmuster verfügen (Screaton et al., 1992; Ruiz et al., 1995; Zöller, 2011). Die Bindung von CD44 an HA erfolgt primär über die Ausbildung von

Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen (Banerji et al., 2007). Diese Interaktion ist reversibel und abhängig von der Größe der gebundenen HA. Kleinere HA-Fragmente bis zu einem Gewicht von 10 kDa binden reversibel, während eine Bindung von Fragmenten, die größer als 30 kDa sind, durch multivalente Interaktionen einen sehr stabilen Charakter besitzt (Wolny et al., 2010). Die Bindungseigenschaften werden neben der Größe der HA auch durch den Aktivierungszustand von CD44 reguliert. Inflammatorische Zytokine, wie TNF- α oder IL-1 α/β , sind in der Lage, eine enzymatische Reaktion einzuleiten, durch die inhibitorische N-Glykosilierungen an der HA-Bindedomäne von CD44 entfernt und eine Interaktion mit HA ermöglicht werden (Levesque und Haynes, 1997; English et al., 1998). Eine Modifikation der HA-Bindefähigkeiten wird auch durch die Bildung von Aggregaten vermittelt, konnte doch in Tumorzellen gezeigt werden, dass Aggregate aus CD44 die Bindungseigenschaften zu HA verbessern (Sleeman et al., 1996).

1.6.4.2 TLR-4 (Toll-like receptor 4)

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind Transmembranproteine und spielen eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort bei der Erkennung allgemeiner pathogener Oberflächenstrukturen. Die Familie der TLRs besteht aus 10 bekannten Mitgliedern (TLR-1-10), wobei jeder Rezeptor unterschiedliche pathogene Komponenten, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) oder doppelsträngige RNA, erkennen und binden kann (Medzhitov, 2001). TLR-4 ist das menschliche Ortholog zum Toll-Protein aus *Drosophila* und spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Neben einer Leuzin-reichen extrazellulären Domäne weist der zytoplasmatische Teil Homologien zum humanen Interleukin-1-Rezeptor auf. Die intrazelluläre Signalkaskade erfolgt meist über den Transkriptionsfaktor NF- κ B, und führt zu einer Aktivierung von Immunzellen (Medzhitov et al., 1997). Eine der Hauptfunktionen von TLR-4 ist die Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS), einem Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien. Die Bindung von LPS an TLR-4 erfolgt über die Corezeptoren CD14 und MD-2 (Haziot et al., 1996; Nagai et al., 2002). Im Rahmen entzündlicher Reaktionen kann es zur Akkumulation von Bruchstücken der EZM kommen. Als Mediator der adaptiven Immunantwort ist TLR-4 in der Lage, Fragmente von Fibronectin, Heparinsulphat und Fibrinogen zu binden und die Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen zu induzieren (Okamura et al., 2001; Smiley et al., 2001; Johnson et al., 2002). Auf die Rolle von TLR-4 in der Vermittlung sHA-abhängiger Effekte wird in dieser Arbeit später ausführlich eingegangen.

1.6.4.3 LYVE-1 (Lymphatic vessel endothelial HA-receptor 1)

LYVE-1 wurde als cDNA-Homolog zu CD44 identifiziert und gehört zur Familie der HA-Bindungsproteine (Banerji et al., 1999). LYVE-1 ist ein Transmembranprotein mit einer Größe von 322 Aminosäuren und besitzt als Mitglied der Link-Protein-Superfamilie ein Link-Modul, das für die HA-Bindung verantwortlich ist (Banerji et al., 1999). Die extrazelluläre Domäne von LYVE-1 ist durch eine Reihe von Sialisierungen und O-Glykosilierungen modifiziert, wobei diese Modifikationen zelltypspezifisch sind und einen Einfluss auf die HA-Bindungseigenschaften von LYVE-1 besitzen (Nightingale et al., 2009). LYVE-1 besitzt wie CD44 ein verlängertes Link-Modul und eine dritte konservierte Disulfidbrücke, die für die Bindung von HA essentiell ist (Banerji et al., 2010). Im Gegensatz zu den Bindungseigenschaften von CD44 basiert die Interaktion von HA an LYVE-1 auf elektrostatischen Kräften und reagiert folglich sehr sensibel auf ionische Ladung (Banerji et al., 2010). Neben diesen unterschiedlichen Wechselwirkungen mit HA unterscheiden sich CD44 und LYVE-1 in der Bindekapazität von sHA. Die kleinsten sHA-Fragmente, die von LYVE-1 gebunden werden können, haben eine Größe von 4 Ds, CD44 ist in der Lage, noch 3 Ds effektiv zu binden (Banerji et al., 2010).

Da LYVE-1 vor allem auf LECs exprimiert wird, wird es sehr oft als lymphatischer Marker benutzt, wobei seine Expression auch auf Makrophagen, bestimmten Leberzellen, embryonalen Blutgefäßen und der Plazenta nachgewiesen werden konnte (Banerji et al., 1999; Mouta Carreira et al., 2001; Gu et al., 2006; Schledzewski et al., 2006; Gordon et al., 2008).

Die Bindung von LYVE-1 an HA und eine Rezeptor-vermittelte Internalisierung von HA wurde in 293-Zellen nachgewiesen (Prevo et al., 2001). Diese Interaktion konnte an Gefrierschnitten und LECs jedoch nicht bestätigt werden (Nightingale et al., 2009). Vielmehr wurde gezeigt, dass LYVE-1 durch eine zelltypspezifische Modifikation seiner extrazellulären Domäne mit α 2,3 – und α 2,6-gebundenen Sialinsäureresten in einer inaktiven Form vorliegt, und in diesem Zustand keine Bindung an HA erfolgt (Nightingale et al., 2009). Im Gegensatz zur Sialisierung von CD44 kann diese Inhibierung nicht durch die Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α aufgehoben werden. Die Behandlung von LECs mit TNF- α und TNF- β bewirkt die Internalisierung von LYVE-1, die anschließende Degradierung in den Lysosomen führt schließlich zur Herunterregulierung der LYVE-1-Genexpression (Johnson et al., 2007). Phorbolster und Neuraminidasen können *in vitro* zwar

eine Abspaltung der Sialinsäurereste herbeiführen, der Stimulus, der zur Bindung von HA an LYVE-1 *in vivo* führen könnte, wurde allerdings nicht identifiziert (Jackson, 2009).

Die genaue physiologische Funktion von LYVE-1 ist unklar. Die Ektodomäne von LYVE-1 konnte im Blutplasma nachgewiesen werden, was ein Indiz dafür sein könnte, dass dieser Rezeptor eine seiner Funktionen in löslicher Form vermittelt (Jackson, 2009). *In vitro* wurde gezeigt, dass CD44 an LYVE-1 gebundenes HA binden kann, woraus gefolgert wurde, dass LYVE-1 eine Rolle in der Transmigration besitzt und in der Wanderung von Leukozyten involviert ist (Jackson et al., 2001). Diese Hypothese wurde jedoch durch die Beobachtung geschwächt, dass in LYVE-1-KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren die Wanderung dendritischer Zellen zu den Lymphknoten nicht verändert ist (Gale et al., 2007). Zusätzlich konnte bei den LYVE-1-KO-Mäusen ein normales Level an HA im Blut und Geweben festgestellt werden, was eine Rolle von LYVE-1 in der HA-Homöostase unwahrscheinlich erscheinen lässt (Gale et al., 2007).

LYVE-1 wird auch als CRSBP-1 (Cell surface retention sequence binding protein-1) bezeichnet und besitzt ein für CRSB-Proteine typisches CRSB-Motif. Diese Proteine spielen eine Rolle bei der Retention von Wachstumsfaktoren wie PDGF-BB oder VEGF-A an der Zelloberfläche und beeinflussen dadurch das Wachstum verschiedener Zelllinien (Boensch et al., 1995, 1999; Huang et al., 2003).

Eine Behandlung von LECs mit hohen Konzentrationen von HA, PDGF-BB oder VEGF-A führte in einem LYVE-1-abhängigen Prozess zu einer Veränderung der VE-Cadherin vermittelten interzellulären Kontakte und resultierte in einem Anstieg der Lymphgeschwindigkeit (Hou et al., 2011). Dabei bildet LYVE-1 einen Komplex mit PDGF β R- β -Catenin und fungiert als Corezeptor von PDGFR- β (Hou et al., 2011). Durch eine Interaktion mit intrazellulären Fibrillstrukturen ist LYVE-1 an der durch CRSBP-1-Liganden wie PDGF-BB oder HA induzierten Kontraktion der Fibrillstrukturen beteiligt, was einen Einfluss auf den Lymphfluss vermittelt (Hou et al., 2012). Die Beeinflussung der Fließgeschwindigkeit der Lymphe kann Einflüsse auf pathologische Prozesse wie Entzündungsreaktionen, Lymphödeme oder Metastasierungen besitzen (Hou et al., 2011). Somit könnte LYVE-1 eine Rolle in der Vermittlung pathologischer Prozesse spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genauen physiologischen Funktionen von LYVE-1 nicht annähernd geklärt oder verstanden sind. In der vorliegenden Arbeit wurden die

Wechselwirkungen dieses Rezeptors mit Fragmenten von HA und die Auswirkungen dieser Interaktion auf die Lymphangiogenese untersucht. Im Folgenden sollen die biologischen Eigenschaften von sHA näher beschrieben werden.

1.7 Hyaluronsäurefragmente

In gesunden Geweben sind nur sehr geringe Mengen an sHA nachzuweisen (Schmaus, Klusmeier et al., unveröffentlichte Daten). Unter pathologischen Bedingungen wie Entzündungen, Wundheilung und im Tumorkontext kommt es aufgrund eines verstärkten Abbaus der HMW-HA zu einem deutlichen Anstieg an sHA (Kumar et al., 1989; Teder et al., 2002). Diese Akkumulation von sHA könnte somit als eine Art intrinsisches Warnsignal fungieren, und eine Reihe von zellulären Reaktionen vermitteln.

1.7.1 sHA induziert Angiogenese

Angiogenese spielt eine zentrale Rolle im Tumorwachstum, versorgt das neugebildete Netzwerk aus Blutgefäßen den Tumor doch mit Nährstoffen und Sauerstoff und liefert invasiven Tumorzellen Eintrittsstellen zur Metastasierung (Plate et al., 1994).

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass sHA, die als eine Gruppe von HA-Fragmenten mit einer Größe von 3-25 Disacchariden definiert ist, pro-angiogen wirkt. Diese Wirkung von sHA konnte erstmals in einem CAM-Assay (Chorioallantoic-membrane-Assay) demonstriert werden, in dem enzymatisch hergestellte sHA einer Größe von 4-25 Disacchariden das Auswachsen von Blutgefäßen stimulierte (West et al., 1985). Die zellulären Vorgänge in der Angiogenese wie Proliferation, Migration und die Ausbildung neuer Gefäßstrukturen werden dabei von sHA konzentrations- und größenabhängig reguliert (West und Kumar, 1989; Rahmanian et al., 1997; Matou-Nasri et al., 2009; Gao et al., 2010). Bei der Proliferation konnte ein konzentrations-abhängiger biphasischer Effekt festgestellt werden, wobei kleinere Fragmente die Proliferation stärker stimulierten als größere sHA-Moleküle (West und Kumar, 1989). Im Gegensatz zum pro-angiogenen Effekt von sHA besitzt HMW-HA keine pro-angiogene oder sogar schwache anti-angiogene Wirkung (West und Kumar, 1989; Rahmanian et al., 1997; Matou-Nasri et al., 2009; Gao et al., 2010). Diese Effekte werden über die Rezeptoren CD44 und RHAMM vermittelt (Gao et al., 2008a; Matou-Nasri et al., 2009).

Zusätzlich zu diesen direkten angiogenen Wirkungsweisen von sHA wurden auch indirekte pro-angiogene Effekte nachgewiesen. Eine Behandlung mit sHA führt in BECs zu einer

Hochregulierung von Typ I und Typ III Kollagen, die beide pro-angiogen wirken (Rooney et al., 1993). Nach einer Stimulation humaner vaskulärer Endothelzellen (HUVECs) mit sHA konnte außerdem neben einer Induktion der Proliferation ein Anstieg des mRNA-Levels von VEGF-A beobachtet werden (Cui et al., 2009).

1.7.2 sHA aktiviert das Immunsystem

Durch eine verstärkte Expression von Hyaluronidasen und Bildung von ROS kommt es in Entzündungsreaktionen und bei Wundheilungsprozessen zu einem verstärkten Abbau von HMW-HA, was zu einem erhöhten Level an sHA führt.

In vitro konnte gezeigt werden, dass es bei mit sHA behandelten Makrophagen zu einer Hochregulierung pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-8 (IL-8), MIP-1 α und Interleukin-12 kommt, wobei die Wirksamkeit der HA-Fragmente stark vom Differenzierungsstatus der Immunzellen abhängig ist (McKee et al., 1996; Hodge-Dufour et al., 1997). Der Differenzierungsstatus selbst ist ebenfalls von sHA beeinflussbar, denn T-Zellen und dendritische Zellen können durch die Regulierung ihrer Hyaluronidase- und Hyaluronsäuresynthase-Expression ihren Reifezustand und ihre Antigenpräsentation modulieren (Mummert et al., 2002). Die Wirkung von sHA auf die Reifung und Zytokinexpression dendritischer Zellen und Makrophagen wird dabei über den extrazellulären Rezeptor TLR-4, eine Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B und eine Aktivierung des ERK-Signalweges vermittelt (Termeer et al., 2000, 2002; Horton et al., 2002). Neben den klassischen Immunzellen sind auch Epithel- und Bindegewebszellen an einer sHA-induzierten Immunantwort beteiligt. *In vitro* induzierte die Behandlung mit sHA die Expression von β -Defensin-2 und IL-8 in Keratinozyten und Epithelzellen der Lunge (Haslinger et al., 2001; Gariboldi et al., 2008). Die Bedeutung von sHA als Immunstimulator konnte *in vivo* bestätigt werden. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass CD44 die Beseitigung von sHA aus entzündetem Lungengewebe vermittelt und dass die Akkumulation von sHA zum Tod der Tiere führte (Teder et al., 2002). Neben CD44 sind auch die Rezeptoren TLR-2, TLR-4 und MyD88 an der Vermittlung der pro-inflammatorischen und immunstimulatorischen Wirkung von sHA beteiligt (Jiang et al., 2005). Aus dem Serum von Mäusen mit akuten Lungenverletzungen gewonnenes sHA war in der Lage, über die Rezeptoren TLR-2 und TLR-4 Makrophagen *in vitro* zu stimulieren und die Expression pro-inflammatorischer Zytokine zu induzieren. In Mäusen, die kein TLR-2, TLR-4 oder MyD88 besaßen, kommt es zu einem verringerten Einwandern von Immunzellen in beschädigtes Gewebe. Außerdem weisen die

Epithelzellen der geschädigten Organe in diesen Tieren eine erhöhte Apoptoserate und eine reduzierte Überlebensrate auf (Jiang et al., 2005).

sHA kann somit als intrinsisches Warnsignal des Körpers eine zentrale Rolle in der Regulation von Immunreaktionen spielen.

1.7.3 sHA induziert die Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Die EZM unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau, der zum Teil durch die Aktivität von Enzymen reguliert wird. Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind Zink-abhängige Endopeptidasen, die in der Lage sind, Komponenten der EZM, wie Kollagen oder Gelatine, zu spalten. Durch die Modulation der EZM sind MMPs an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen wie der Morphogenese, Wundheilung, Angiogenese und Metastasierung beteiligt (Hua et al., 2011). Eine Überexpression von MMPs in Tumorzellen oder dendritischen Zellen führt zu einem verstärkten Einwandern der Zellen in benachbartes Gewebe (Noirey et al., 2002). Hyaluronsäurefragmente können die Aktivität und Expression dieser Enzyme regulieren. In Melanom- und Lungenkarzinomzellen sowie Fibroblasten bewirkte sHA über eine NF- κ B-abhängige intrazelluläre Signalkaskade einen starken Anstieg der MMP-2-, MMP-9- und MMP-13-Expression (Fieber et al., 2004; Voelcker et al., 2008). Dadurch verstärkt sHA das invasive Verhalten der Tumorzellen und unterstützt somit die Bildung von Metastasen (Fieber et al., 2004; Voelcker et al., 2008). Eine Behandlung muriner Monozyten mit sHA führte ebenfalls zu einem Anstieg der MMP-Expression und könnte ein Beleg für die Rolle dieser Fragmente in der Regulierung der Extravasation von Immunzellen unter pathologischen Bedingungen sein (Horton et al., 1999). Die proteolytische Aktivität von Endothelzellen kann durch eine sHA-abhängige und VEGF-gekoppelte Regulierung der Urokinase Typ PA moduliert werden, wobei eine weitere Art der sHA-abhängigen Regulierung der Angiogenese deutlich wird (Montesano et al., 1996).

1.7.4 sHA im Tumorkontext

Wie bereits beschrieben, findet bei Entzündungsreaktionen und Prozessen der Wundheilung ein verstärkter Abbau von HMW-HA statt. Im Tumorkontext führt die Aktivierung und Überexpression von Hyaluronidasen und Hyaluronsäuresynthasen sowie die Bildung und Aktivität von ROS zu einem Anstieg der sHA-Konzentration (Beech et al., 2002; Posey et al., 2003; Udabage et al., 2005; Aboughalia, 2006; Kumar et al., 2008; Simpson, 2006; Bharadwaj et al., 2009). sHA kommt durch die Beeinflussung der Angiogenese, der

Modulation der Immunantwort und der Regulierung von MMPs eine wichtige Rolle in der Tumorprogression bei (West et al., 1985; Rooney et al., 1993; Sattar et al., 1994; Termeer et al., 2000, 2002; Fieber et al., 2004; Gariboldi et al., 2008; Voelcker et al., 2008; Gao et al., 2010). Bei Patienten mit Blasenkrebs, Nierentumoren oder Prostatakrebs dient eine erhöhte sHA-Konzentration in den Körperflüssigkeiten als ein prognostischer Marker und geht mit einer schlechten Prognose einher (Kumar et al., 1989; Lokeshwar et al., 1997, 2001). Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, dass in Stabilin-2-KO-Mäusen eine erhöhte Menge an HA im Serum mit einer Inhibierung der Metastasierung von Melanomzellen einhergeht (Hirose et al., 2012). Eine hohe HA-Konzentration in der Zirkulation könnte hierbei die Bindung zirkulierender Melanomzellen an potentielle Zielorgane blockieren und somit die Metastasenbildung inhibieren.

Neben seinen tumorfördernden Effekten besitzt sHA auch eine Reihe anti-tumoraler Eigenschaften. Es konnte gezeigt werden, dass sHA die Tumorigenität von Osteosarkomzellen *in vitro* und *in vivo* durch die Zerstörung und Remodulierung der HA-reichen perizellulären Matrix verringert (Hosono et al., 2007). Eine CD44-abhängige Akkumulation von sHA führte zu einer verringerten Retention von HMW-HA, was mit einer geringeren Motilität und verringertem invasiven Verhalten der Tumorzellen einherging (Hosono et al., 2007). Im Tiermodell führte die intratumorale Injektion von sHA zu einer reduzierten Akkumulation von HMW-HA und einer Inhibierung der Metastasenbildung (Hosono et al., 2007). Durch die Modulation der Aktivität des ABC-Transporters P-Glykoprotein und des PI3/Akt-Signalweges ist sHA in der Lage, die Empfindlichkeit von Tumorzelllinien gegenüber Chemotherapeutika über einen CD44-abhängigen Mechanismus zu steigern (Cordo Russo et al., 2008). Durch eine sHA-abhängige Hochregulierung der Expression des Hitzeschockproteins Hsp-72 hingegen, kann die Resistenz von leukämischen Zellen gesteigert werden (Xu et al., 2002).

1.7.5 sHA-vermittelte Signaltransduktion

Bei der Vermittlung seiner zahlreichen Funktionen bedient sich sHA verschiedener Zellsignalwege, die zum Teil schon in früheren Kapiteln beschrieben wurden. In diesem Abschnitt sollen nun weitere Signalwege genannt werden, die durch sHA in verschiedenen Zellen aktiviert oder inhibiert werden.

Die Behandlung von Endothelzellen mit sHA führte zu einer CD44-abhängigen Aktivierung und Hochregulierung der sogenannten Early-Response-Gene c-fos, c-jun, jun-b, Krox-20 und Krox-24 (Deed et al., 1997). Hierbei ist eine langanhaltende Behandlung mit sHA nötig, um die Proliferation der Endothelzellen zu induzieren (Deed et al., 1997). Eine CD44-abhängige Hochregulierung der Proteinkinase C und die Aktivierung von ERK konnte bereits nach einer einminütigen Behandlung von Endothelzellen mit 1 µg/ml sHA beobachtet werden. Eine Inhibierung von CD44 oder des ERK-Signalweges führte zu einer Blockade der sHA-induzierten Proliferation der Zellen (Slevin et al., 1998). *In vitro* wurde gezeigt, dass sHA angiogene Eigenschaften von Endothelzellen durch die Regulierung der Aktivität von G-Proteinen, der Phospholipase C γ 1 und der Proteinkinase C reguliert, wobei der ERK-Signalweg und die koordinierte Aktivität bestimmter Adapterproteine zusätzlich von Bedeutung sind (Slevin et al., 2002). Eine weitere zentrale Rolle von CD44 in der sHA-vermittelten Signaltransduktion konnte bei verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Die Behandlung mit sHA führt in humanen Chondrosarkomzellen zu einem Anstieg der Expression von c-Met, dem Rezeptor von HGF, und einer Induktion der c-Met-Phosphorylierung, in HeLa-, MCF-7- und T-24-Karzinomzellen kommt es zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalweges (Fitzgerald et al., 2000; Suzuki et al., 2002). Somit konnte eine sHA-abhängige Aktivierung dieses Signalweges sowohl in Immunzellen als auch in Tumorzellen nachgewiesen werden (Fitzgerald et al., 2000; Suzuki et al., 2002; Termeer et al., 2002). Neben der Aktivierung konnte auch eine sHA-abhängige Inhibierung von intrazellulären Signaltransduktionen nachgewiesen werden. Durch die Hemmung der PIP(3)-Produktion und einer Inhibierung der Akt-Phosphorylierung induzierte sHA NF- κ B-unabhängig Apoptose von Lymphoma-Zellen (Alaniz et al., 2006).

1.8 Ziele dieser Arbeit

Lymphangiogenese besitzt eine wichtige Rolle in einer Reihe von pathologischen Prozessen wie Entzündungen, Lymphödemen und der Metastasierung. Ein besseres Verständnis in der zellulären und molekularen Regulation der Lymphangiogenese sowie die Identifizierung neuer, bislang unbekannter lymphangiogener Faktoren wären wichtige Schritte, um eine gezielte Steuerung der Lymphangiogenese im Rahmen lymphangiogener Therapien zu ermöglichen.

Niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente sind als bioaktive Moleküle an einer Reihe von pathologischen Prozessen beteiligt. Über ihre Rolle in der Lymphangiogenese ist bislang

jedoch noch nichts bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Wirkung von sHA auf die Lymphangiogenese untersucht werden.

Insbesondere wurde den folgenden Fragen nachgegangen, die sich zum Teil auch erst im Laufe der Arbeit ergaben:

1. Beeinflusst sHA funktionelle Eigenschaften von LECs wie Proliferation, Migration, die Ausbildung gefäßartiger Strukturen und den Zellzyklus?
2. Spielen dabei Größe, Konzentration und chemische Struktur der sHA eine Rolle?
3. Handelt es sich bei der Wirkung von sHA auf LECs um einen direkten oder indirekten Effekt und welcher Rezeptor ist für die Vermittlung verantwortlich?
4. Welche Signalwege sind an der Vermittlung dieser Interaktion beteiligt?
5. Besitzt sHA einen Einfluss auf den lymphatischen Charakter der LECs?
6. Welche Rolle besitzt LYVE-1 in der Metastasierung sHA-produzierender Tumore?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Acrylamid (30% und 40%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen
ANDS (7-Amino-1,3-naphtalendisulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth
β - Mercaptoethanol	Carl Roth
BioGel-P10 fine	BioRAD, München
Bromphenolblau	SERVA, Heidelberg
BSA (Bovines Serumalbumin)	PAA, Pasching
DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)	Invitrogen, Darmstadt
dNTPs	Peqlab
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth
DNA-Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Draq5	Biostatus, Leicestershire, Vereinigtes Königreich
DTT (Dithiothreitol)	Roche, Mannheim
ECL-Lösungen	Thermo Scientific, Bonn
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Gelantine	Merck, Darmstadt
Glycerol	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Healon 5	AMO, Ettlingen
Isopropanol	Merck

Material

Kaliumchlorid	Carl Roth
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg
Methanol	Carl Roth
Natriumacetat	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumcyanoborhydrid	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth
NP-40	Sigma-Aldrich
PBS	Life Technologies, Paisley, Vereinigtes Königreich
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich
Proteinmarker IV	Peqlab
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Protein G-Plus Agarose	Merck
PVA (Polyvenylalkohol)	Carl Roth
Salzsäure	Merck
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Carl Roth
Strataclean-Beads	Agilent Technologies, Waldbronn
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth
³ H-Thymidin	Hartmann Analytik, Göttingen
Tris-(Base)	Carl Roth
Tris-HCl	Carl Roth
Triton X-100	Carl Roth
Tween 20	Carl Roth

2.1.2 Zellkulturchemikalien

Chemikalien

Bezugsquelle

Fötale Kälberserum (FCS)

PAA

Penicillin/Streptomycin	Life Technologies
Trypsin	Life technologies

2.1.3 Zellkulturmedien

Medium	Zusätze	Bezugsquelle
DMEM- Medium	10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin; 4,5 g/L Glukose; L-Glutamine und Pyruvat	Life Technologies
EBM-2 Medium	5% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin	Lonza, Basel, Schweiz
EGM-2MV Medium	5% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin; Zusätze (Hydrocortison; hFGF; VEGF; R3-IGF; Ascorbinsäure; hEGF; GA-100)	Lonza

2.1.4 Antikörper und Lektine

Antikörper/Lektine	Hersteller	Isotyp	Verwendung	Konzentration/ Verdünnung
anti-human Akt 1/2/3	Santa Cruz Biotechnology	Kaninchen IgG	Western Blot	1:1000
anti-human p-Akt (Ser473)	Cell Signaling	Kaninchen IgG	Western Blot	1:1000
anti-human ATF-2 (N96)	Santa Cruz Biotechnology	Kaninchen IgG	Western Blot	1:1000
anti-human p-ATF-2 (Thr71)	Cell Signaling	Kaninchen IgG	Western Blot	1:1000
anti-human β -Aktin	Sigma-Aldrich	Maus IgG	Western Blot	1:10.000
PE anti-human CD140a	BD Biosciences	Maus IgG2a	FACS	10 μ g/ml

Material

PE anti-human CD140b	BD Biosciences	Maus IgG2a	FACS	10 µg/ml
Hermes 3 (anti-CD44)	J.Sleeman	Maus IgG2a	FACS	1:100
IM-7 (anti-CD44)	J.Sleeman	Ratte IgG2b	Blockierung	50 µg/ml
anti-human Interleukin-6	Gen-Probe	Maus IgG ₁	Blockierung/ Neutralisierung	20 µg/ml
anti-human JNK 1/3	Santa Cruz Biotechnology	Kaninchen IgG	Western Blot	1:1000
anti- human p- SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling	Kaninchen IgG	Western Blot	1:1000
anti-human LYVE1	R&D Systems	Ziege IgG	Western Blot Blockierung	1 µg/ml 20 µg/ml
anti-human LYVE-1	R&D Systems	Maus IgG ₁	Blockierung	20 µg/ml
anti-human LYVE-1	ReliaTech	Kaninchen IgG	FACS Immunpräzipitation	2,5 µg/ml 3 µg/ml
anti-human LYVE-1 mAB 3A	D.Jackson	Maus IgG ₁	Blockierung	20 µg/ml
anti-human NF-κB p65	Santa Cruz Biotechnology	Kaninchen IgG	Immunfluoreszenz	1 µg/ml
anti-human Prox-1	ReliaTech	Kaninchen IgG	Western Blot Immunfluoreszenz	5 µg/ml 1 µg/ml
anti-human p38 MAP-Kinase	Cell Signaling	Kaninchen IgG	Western Blot	1:1000
anti-human p-p38 MAPK (Thr180/182)	Cell Signaling	Kaninchen IgG	Western Blot	1:1000

Material

anti-human ERK	Santa Cruz Biotechnology	Kaninchen IgG	Western Blot	1:1000
anti-human p-p44/42 MAPK (Thr202/Thyr204)	Cell Signaling	Kaninchen IgG	Western Blot	1:1000
anti-human TGF- β -1/2/3	R&D Systems	Maus IgG ₁	Blockierung/ Neutralisierung	20 μ g/ml
anti-human TLR-4	eBioscience	Maus IgG _{2a}	Blockierung	20 μ g/ml
anti-human TLR-4	Acris Antibodies	Maus IgG _{2a}	FACS	30 μ g/ml
anti-human VEGFR-3	R&D Systems	Ziege IgG	Western Blot	0,2 μ g/ml
anti-human Vimentin	R&D Systems	Ziege IgG	Western Blot	0,1 μ g/ml
anti-human Vincullin	Sigma-Aldrich	Maus IgG ₁	Western Blot	1:1000
Maus IgG ₁	R&D Systems	-	-	-
Maus-IgG _{2a}	eBioscience	-	-	-
Ratten-IgG ₁	ReliaTech	-	-	-
Ratten-IgG ₂	ReliaTech	-	-	-
anti-Maus-IgG HRP	Cell Signaling	-	Western Blot	1:1000
anti-Maus IgG HRP	Dako	-	Western Blot	1:1000
anti-Ziege IgG HRP	Dako	-	Western Blot	1:1000
Alexa-Fluor 488 Ziege α -Kaninchen IgG	Invitrogen	-	Immunfluoreszenz	1:500
PE Maus IgG _{2a}	BD Biosciences	-	FACS	10 μ g/ml

Material

<i>Sambucus nigra</i>	EY	-	Immunpräzipitation	
Lektin-Agarosebeads	Laboratories			
<i>Maackia amurensis</i>	EY	-	Immunpräzipitation	-
Lektin-Agarosebeads	Laboratories			

2.1.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
DreamTaq Polymerase	Fermentas
Hyaluronidase aus Rinderhoden (BTH)	Sigma-Aldrich
Hyaluronidase aus <i>Streptomyces hyalurolyticus</i>	Sigma-Aldrich
Super Script II Reverse Transkriptase	Life Technologies
α -2-3,6,8,9-Neuraminidase, <i>Arthrobacter ureafaciens</i>	Calbiochem, Darmstadt

2.1.6 Zytokine und Inhibitoren

Zytokin/Inhibitor	Hersteller
CLI-095	InvivoGen, San Diego, USA
Human FGF-2	ReliaTech, Wolfenbüttel
Human Interleukin-6	ReliaTech
Human PDGF-BB	ReliaTech
Protease-Inhibitor-Mix HP	SERVA
Human TGF- β -1	ReliaTech
Human TGF- β -2	ReliaTech
Human TGF- β -3	ReliaTech
Human VEGF-C	ReliaTech

2.1.7 Primer

Gen	Referenz-sequenz	Primersequenz (Forward und Reverse Primer)	Amplifizierte Sequenz
PDGF α R (human)	NM_006206.4	5`- TGAAGGACGCCGCTTCCTTG-3` 5`-AGAACGCAGGGTGGGAGCCA-3`	1642-1660 1900-1881
PDGF β R (human)	NM_002609.3	5`-TGCCGZGCAGCCCAATGAGG-3` 5`-CTCTGGCTCCGGCTCACCT-3`	3499-3518 3724-3710
HPRT (human)	NM_000194.2	5`-CACATTGTAGCCCTCTGTGTGC-3` 5`-GTTGAGAGATCATCTCCACCAATTAC-3`	348-369 538-513
LYVE-1 common		5`-GCATCTAACCCAGCGAGCAGTCCGTGTG-3`	
LYVE-1 WT		5`-GACACCTTTGCCATTCTTCCCACACC-3`	
LYVE-1 Mut		5`-GCAGAGAGGGAGGAGG-3`	

Die Primersequenzen für die Genotypisierung der Balb/c.129S1-Lyve1^{tm1Lhua}/J-Mäuse (LYVE-1 common, WT und Mut) stammten von: The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA.

2.1.8 Kits

Kit	Nachweis	Bezugsquelle
Hyaluronsäure ELISA Kit	Quantifizierung von HMW-HA und sHA	Echelon; Salt Lake City, USA

2.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Amicon Zentrifugationsfilter	Millipore, Schwalbach
Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Axiovert 200M fluo	Zeiss
β - Strahlungsmessgerät	Wallac, Turku, Finnland
Biofuge pico Zentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank (Primärzellen) APT.Line CB	Binder, Tullingen

Material

Brutschrank (Tumorzellen) Labotect C200	Labotect, Göttingen
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einschweißgerät	Bosch, Karlsruhe
Elektrophorese Kammern	Thermo Scientific
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Erntegerät	Tomtec, Hamden, USA
FACS-Gerät	BD Biosciences
FACS-Röhrchen	BD Biosciences
Filme	Fuji, Düsseldorf
Filmentwicklungs-Kammer	Dr.Goos Suprema, Heidelberg
Glasfasermatte	Wallac
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Immobilion PVDF-Membran	Millipore
Kühlzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf
Magnetrührer MR 3000	Heidolph, Schwabach
Megafuge 1.0 Zentrifuge	Heraeus Instruments
Megafuge 3.0R Zentrifuge	Heraeus Instruments
Nylon- Filter 40µm	BD Biosciences
Objektträger lab-tec	Thermo Scientific
PCR-Zykler Flexcycler	Analytik Jena, Jena
Pipettierhilfe accu-jet	Brand, Wertheim
Pipette 20µl	Gilson, Middleton
Pipette 200µl	Gilson
Pipette 1000µl	Gilson
Schüttler KS-15	Edmund Bühler, Hechingen
Schwenker	Heidolph Reax-2, Schwabach
Spannungsgerät Power Pac 300	BioRAD
Sterilbank	CleanAir, Woerden
Vortex Genie-2	Scientific Industries, New York, USA
Waage PM 300	Mettler-Toledo, Gießen
Wasserbad	Fried Electric, Haifa
Zellkultur-Einsätze	Ibidi, Martinsried

2.1.10 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Agarosegele	1,5% Agarose in TAE-Puffer; 0,3 µg/ml Ethidiumbromid
ANDS-Lösung	0,051 g ANDS in 15% Essigsäure
Blockierlösung	10% Ziegenserum; 1% BSA
BSA-Puffer (1 l)	40 g BSA; 5 ml Tween 20; 100 ml 10 x TBS
FACE-Gel-Laufpuffer 10 x	1,92 M Glycin; 0,25 M Tris pH 8,3
FACE-Gel Probenpuffer	62 mM Tris pH 6,8; 20% Glycerin; Bromphenolblau
FACS-Puffer	PBS mit 2% FCS
Fixierlösung	4% PFA in PBS
Immunpräzipitations-Lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1% NP-40; 1:100 Protease-Inhibitoren
Milchpuffer (1 l)	40 g Milchpulver; 5 ml Tween 20; 100 ml 10 x TBS
NaCNBH ₄ -Lösung	0,063 g in DMSO
PBND-Puffer	50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,5; 2,5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O; 0,1 mg/ml Gelantine; 0,45% NP-40; 0,45% Tween 20
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄
Permeabilisierungs-Lösung	0,1% Triton-X-100; 1% BSA in PBS
Probenpuffer 2 x (50 ml)	10 ml 10% SDS; 6,375 ml 1 M Tris HCl pH 6,8; 5 ml Glycerol; 50 µl Bromphenolblau
Pull-down-Lysis Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1% NP-40; 1:100 Protease-Inhibitoren
SDS-PAGE-Laufpuffer 10 x (5 l)	151,5 g Tris Base; 721 g Glycin; 250 ml 20% SDS
TAE-Puffer 50 x	40 mM Tris; 5,7% Essigsäure; 1 mM EDTA pH 8,5

Material

TBS pH 7,6 10 x (5 l)	151,5 g Tris Base; 400 g NaCl; HCl konz. => pH 7,6
TBST	0,1% Tween 20 in TBS
Transferpuffer (3 l)	600 ml Methanol; 150 ml Westernblot-Laufpuffer; 150 ml SDS-Laufpuffer
Western-Blot-Puffer 10 x (5 l)	121 g Tris Base; 721 g Glycin; 25 ml 20% SDS
Western Blot-Stripping-Lösung (100 ml)	6,25 ml Tris pH 6,8; 10 ml 20% SDS; 750 µl β-Mercaptoethanol

2.1.11 Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Medium	Bezugsquelle/Literatur
Humane LECs	Humane Lymphendothelzellen aus Vorhaut	EGM-2MV Medium	Promocell
Humane Perizyten		Spezialmedium	ScienCell Research, Carlsbad
Humane glatte Muskelzellen		Spezialmedium	Lonza
Humane mesenchymale Stromazellen		DMEM-Medium	Karen Bieback, Mannheim
4T1	Murine Brustkrebszellen	DMEM- Medium	Aslakson und Miller 1992

2.1.12 Mäusestämme:

Stamm	Quelle
Balb/c.129S1-LYVE-1	ITG, Karlsruher Institut für Technologie
Balb/c-Wildtyp	ITG, Karlsruher Institut für Technologie
B6.129S1-Lyve1 ^{tm1Lhua} /J	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA

2.2 Methoden:

2.2.1 DNA-Methoden

2.2.1.1 Bestimmung des Genotyps von Balb/c.129S1-Lyve1^{tm1Lhua}/J-Mäusen

Vor der Durchführung der Tumorimplantationsversuche wurde der Genotyp von denen aus der Züchtung von Wildtyp-Balb/c- und homozygoten B6.129S1-Lyve1^{tm1Lhua}/J-Mäusen generierten Balb/c.129S1-Lyve1^{tm1Lhua}/J-Mäuse bestimmt.

2.2.1.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Zur Bestimmung des Genotyps wurde die DNA zuerst aus Stücken von Mäuseschwänzen isoliert. Hierfür wurden diese über Nacht in 200 µl PBND-Puffer bei 55 °C verdaut. Anschließend wurde der Verdau durch Erhitzen bei 95 °C für 10 min abgestoppt. Die Proben wurden abzentrifugiert und kurz gevortext.

2.2.1.1.2 Genotypisierung von Mäusen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe spezifischer Primer lässt sich der Genotyp der Balb/c.129S1-LYVE-1-Mäuse bestimmen. Durch ihre spezifische Struktur binden Primer an definierte Abschnitte der isolierten genomischen DNA und legen somit die Amplifikation definierter DNA-Bereiche fest. Verfügt eine Maus über ein mutiertes LYVE-1-Gen (MUT), erfolgt die Amplifikation eines 400 bp großen Fragments, ist das Gen intakt, wird ein 500 bp großes Fragment amplifiziert (WT).

Für jede zu analysierende Probe wurde ein Ansatz von 25 µl aus folgenden Komponenten gewählt: 10 pmol Primer Wildtyp oder Mutiert, 10 pmol Primer Common, 0,2mM dNTPs, 0,25 µl DreamTaq Polymerase, 2,5 µl 10 x PCR-Puffer, 18 µl H₂O und 3 µl Verdau.

Die Genotypisierung erfolgte mittels eines PCR-Zyklus. Für die Amplifikation des LYVE-1-MUT-Gens erfolgte eine initiale Denaturierung bei 94 °C für 3 min, eine Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, das Annealing bei 62 °C für 1 min, die Elongation bei 72 °C für 1 min gefolgt von einer Endverlängerung bei 72°C für 2 min. Die Amplifikation des LYVE-1-WT-Gens erfolgte bei einer initialen Denaturierung bei 94 °C für 3 min, einer Denaturierung bei 94 °C für 3 min, einem Annealing bei 62 °C für 1 min, einer Elongation bei 72 °C für 1 min, gefolgt von einer Endverlängerung bei 72 °C für 2 min. Die PCR erfolgte jeweils für 30 Zyklen.

2.2.1.1.3 Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe erfolgt mittels Gelelektrophorese. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrats der DNA-Helix wandert diese im elektrischen Feld Richtung Anode. Je größer das Fragment, desto langsamer wandert dieses durch das Gel und das elektrische Feld, wodurch eine Größenauftrennung erfolgt.

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 1,5%ige Agarosegele gegossen. Die berechnete Menge Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Nach dem Abkühlen unter fließendem Wasser wurde 0,3 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben, die in die DNA interkaliert und der Visualisierung der Desoxyribonukleinsäuren im UV-Licht dient. Das flüssige Gel wurde in eine Kammer gegossen und ein Probenkamm eingesteckt. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Kamm entfernt, die Kammer mit 1 x TAE-Puffer gefüllt, die Proben und 5 µl DNA-Marker geladen und eine Spannung von 80 V angelegt. Nach 1-1,5 h wurde das Gel unter dem UV-Licht begutachtet und fotografiert.

2.2.2 Protein-Methoden

2.2.2.1 Herstellen von Zellysaten zur Proteinanalyse

Zur Herstellung von Lysaten aus eukaryotischen Zellen wurden diese im Zellkulturgefäß 1 x mit PBS gewaschen und mit PBS/5 mM EDTA bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen mit Kulturmedium gut abzuspülen waren. Sollte der Zellüberstand analysiert werden, wurde dieser abgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden zur Aufreinigung 2 µl Strataclean-Beads zum Überstand pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur (RT) rotiert. Danach wurden die Beads bei 965 g für 3 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Beads in 100 µl 2 x Proben-Puffer aufgenommen. Die abgespülten Zellen wurden bei 301 g für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Nach anschließender Zentrifugation wurden die Zellen erneut bei 301 g für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in einem definierten Volumen Probenpuffer aufgenommen, um eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml zu erhalten. Die Zellen wurden anschließend im Ultraschall aufgebrochen. Die Zellysate können bei Bedarf bei -20 °C gelagert werden.

2.2.2.2 Vorbereiten der Proben für Gelelektrophorese

Die für die Analyse vorgesehenen Zelllysate wurden für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Abhängig von dem später verwendeten Antikörper war es notwendig, die Proben mit 100 mM DTT zu versetzen, das die Disulfidbrücken der Proteine spaltet. Nach dem Aufkochen wurden die Proben kurz abzentrifugiert und standen somit einer elektrophoretischen Analyse mittels SDS-PAGE zur Verfügung.

2.2.2.3 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese)

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine unabhängig von ihrer nativen Ladung der Größe nach aufgetrennt werden. SDS ist ein anionisches Tensid, das durch seine starke negative Ladung die Eigenladung der Proteine überdeckt. Aufgrund der ihnen aufgezwungenen negativen Ladung wandern bei dieser Gelelektrophorese alle Proteine in Richtung Anode. Kleine Proteine wandern dabei im Gel schneller als größere Proteine. Durch Modifikation der Porengröße kann die Auftrennung der Proteine den gewünschten Erfordernissen angepasst werden.

In der Regel besteht ein SDS-Gel aus einem Sammel- und einem Trenngel. Diese Gele unterscheiden sich bezüglich der Porengröße, der Salzkonzentration und des pH-Wertes. Mit Hilfe des Sammelgels soll eine einheitliche Lauffront der Proben erzielt werden, im Trenngel erfolgt anschließend die eigentliche Größenauftrennung der Proteine.

Vor dem Gießen des Gels wurden die Glasplatten, die Spacer und die Kammer gründlich mit Wasser und 70% Ethanol gereinigt. Anschließend wurden die Spacer zwischen die beiden Glasplatten gelegt. Die Glasplatten samt Spacer wurden in eine Tüte überführt und in der Gießvorrichtung justiert. Dann wurde das Trenngel gegossen.

Die Trenngele wurden jeweils in einem 30 ml Ansatz gegossen. Allen Gelen gemeinsam waren folgende Komponenten: 7,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 0,3 ml 10% SDS, 0,3 ml 10% APS und 0,018 ml TEMED. Für ein 8%iges Gel wurden 13,9 ml H₂O und 8 ml Acrylamid-Mix, für ein 10%iges Gel 11,9 ml H₂O und 10 ml 30% Acrylamid-Mix und für ein 15% Gel 6,9 ml H₂O und 15 ml Acrylamid-Mix verwendet.

Nach dem Gießen wurde das Trenngel mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Gel mehrfach mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und auf das Trenngel

aufgetragen. Die Zusammensetzung des Sammelgels war bei allen durchgeführten SDS-PAGEs gleich und bestand aus 6,8 ml H₂O, 1,7 ml 30% Acrylamid-Mix, 1,25 ml 1 M Tris pH 6,8, 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS, 0,01 ml TEMED und 0,01 ml Bromphenolblau.

In das frisch gegossene Sammelgel wurde der Probenkamm eingeführt. Nach der vollständigen Polymerisation des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophorese-Kammer überführt. Hier wurden die Probenaschen mit SDS-PAGE-Laufpuffer gespült und die Kammer mit Puffer gefüllt. Die zu analysierenden Proben wurden in die Taschen gefüllt und ein Proteinmarker als Referenz geladen. Bei einer Spannung von 50 V wurde nach ca. 1 h eine einheitliche Lauffront erreicht. Nach dem Übertritt vom Sammelgel zum Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht, wobei nach mehreren Stunden eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte.

2.2.2.4 Western Blot

Der Western Blot ermöglicht es, Proteine, die mittels SDS-PAGE basierend ihrer Größen elektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine Membran zu überführen und dort spezifisch mittels Antikörpern zu detektieren.

Beim Western Blot wurde das SDS-Gel auf eine dreifache Lage von 3 mm Whatman-Papier aufgelegt. Darauf wurde eine zuvor in Methanol aktivierte PVDF-Membran ausgelegt, gefolgt von einer weiteren Schicht aus Whatman-Papier. Sowohl die Ober- als auch die Unterseite dieser Lage wurde von einem Schwamm bedeckt. Das Whatman-Papier und die Schwämme wurden vor dem Gebrauch in Transferpuffer angefeuchtet. Während des Zusammenbaus des Blots musste sorgfältig darauf geachtet werden, dass vorhandene Luftblasen durch Ausrollen der Lagen entfernt wurden. Die Lage aus Schwamm, Whatman-Papier, SDS-Gel und Membran wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Der Transfer der Proteine vom Gel zur Membran erfolgte bei 300 V x h und 4 °C über Nacht.

Nach dem erfolgten Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran wurde diese für mindestens 1 h bei RT mit Milchpuffer bzw. 1% BSA-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungen der später verwendeten Antikörper zu reduzieren. Danach erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers, der in Milchpuffer oder BSA-Lösung und in einer geeigneten Verdünnung auf die Membran gebracht wird. Die Inkubation erfolgte in der Regel für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubation der Membran mit dem passenden HRP-gekoppelten

sekundären Antikörper erfolgte für 30 min bei RT. Nach weiteren Waschschritten wurde die Membran in eine Filmbox überführt. Durch Zugabe von ECL wurde eine chemische Reaktion eingeleitet, die es ermöglichte, die Proteine mit Hilfe eines ECL-Films zu detektieren.

2.2.2.5 Strippen von Western-Blot Membranen

Eine mit Proteinen geblottete Membran kann mehrmals mit verschiedenen Antikörpern inkubiert werden. Hierfür muss sie jedoch vor einer erneuten Antikörper-Inkubation gestrippt werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran mit einer Stripping-Lösung für 20 min bei 55 °C im Wasserbad behandelt. Zur vollständigen Entfernung der Stripping-Lösung wurde die Membran anschließend mindestens dreimal mit PBS gewaschen.

2.2.2.6 Immunpräzipitation (IP) zur Untersuchung des Sialisierungsstatus von LYVE-1

Bei einer Immunpräzipitation können mit Hilfe spezifischer Antikörper aus einem Proteingemisch bestimmte Proteine isoliert werden. Die Identität und Quantität der Proteine kann anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen und bestimmt werden. Bei der hier verwendeten Art der IP sollte untersucht werden, ob LYVE-1 durch die Modifikation mit Zuckerresten, was als Sialisierung bezeichnet wird, eine Veränderung in der Laufhöhe im SDS-PAGE aufweist.

LECs wurden in 10 cm Schalen kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die LECs mit je 750 µl Lysispuffer für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann abgeschabt und zur vollständigen Lyse mehrmals durch eine Kanüle gezogen. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 17949 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder mit dem Enzym Neuraminidase aus *Arthrobacter ureafaciens* (125 mU/ml) inkubiert, das in der Lage ist, sialisierte Strukturen abzuspalten oder blieb unbehandelt. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 1 h wurde entweder LYVE-1-Antikörper mit einer Konzentration von 3 µg/ml oder die passende Isotypkontrolle hinzugeben. Die IP erfolgte bei 4 °C über Nacht. Danach wurden zu jedem Ansatz 40 µl Protein-G-Agarose-Beads zum Markieren der LYVE-1- und Isotypkontroll-Antikörper hinzugegeben und bei 4 °C für 4 h inkubiert. Anschließend wurde bei 425 g für 3 min bei 4 °C zentrifugiert, dreimal mit Lysis-Puffer gewaschen und das Pellet in 50 µl Proben-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden mittels 8 %igen SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.2.7 Lektin-Pull-down-Assay

Lektine sind Proteine, die spezifisch an Zuckerstrukturen binden. Mit Hilfe dieser Eigenschaft sollte untersucht werden, ob und wie LYVE-1 bei den verwendeten LECs sialisiert ist. In diesem Versuch wurden Lektine aus *Maackia amurensis* (MAA) verwendet die spezifisch an α 2-3-gebundene sialisierte Endstrukturen binden.

Für den Lektin-Pull-down-Assay wurden LECs wie in 2.2.2.6 beschrieben lysiert und Zellbruchstücke durch Zentrifugation entfernt. Das Lysat wurde für 1 h bei 37 °C mit dem Enzym Neuraminidase von *Arthrobacter Ureafaciens* inkubiert oder blieb unbehandelt. Diese Neuraminidase ist in der Lage, spezifisch Sialinsäurereste zu erkennen und abzuspalten. Nach erfolgter Neuraminidase-Behandlung wurden zu den Proben 40 μ l immobilisierte MAA-Lektine hinzugegeben. Der Lektin-Pull-down erfolgte für 4 h bei 4 °C. Anschließend wurden die Lektine bei 425 g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Lektin-Beads wurden dreimal mit Lysis-Puffer gewaschen und in 50 μ l Proben-Puffer resuspendiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels 8%igen SDS-PAGE und Western Blot.

Um den Anteil an unsialiliertem LYVE-1 zu bestimmen, wurden die LECs lysiert und das Lysat mit Neuraminidase für 1 h bei 37 °C behandelt. Anschließend erfolgte ein MAA-Lektin Pull-down-Assay. Der Überstand der Proben wurde anschließend für eine LYVE-1-IP verwendet. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot.

2.2.2.8 FACS

Mit Hilfe der FACS (Fluorescence-activated cell-sorting)-Analyse können verschiedene Eigenschaften von Zellen untersucht werden. Zum einen können die Granularität und Expression bestimmter Proteine auf der Oberfläche untersucht, zum anderen der Zellzyklus analysiert werden. Die zu untersuchenden Strukturen (DNA oder Proteine), werden dabei mit einem Farbstoff markiert. Bei der FACS-Messung werden die Zellen nacheinander durch ein dünnes Röhrchen in der FACS-Apparatur gedrückt und zu einem Laserstrahl weitergeleitet, der den Farbstoff anregt.

Zur Untersuchung der Oberflächenexpression von Proteinen wurden die Zellen zuerst mehrmals mit PBS gewaschen und zur Ablösung mit 5 mM EDTA/PBS behandelt. Die abgelösten Zellen wurden bei 301 g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in PBS/2% FCS aufgenommen. Pro Probe wurden 1×10^6 Zellen in ein well einer 96-well Platte

pipettiert. Zur Detektion von Oberflächenproteinen wurden die Zellen mit 100 µl einer Primärantikörper-Lösung für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde bei 301 g für 3 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit PBS/ 2% FCS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des passenden, den Fluoreszenzfarbstoff-tragenden Sekundärantikörpers in 100 µl Volumen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4 °C. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, dreimal mit PBS/ 2% FCS gewaschen, in 500 µl PBS/ 2% FCS aufgenommen und in ein FACS-Analyseröhrchen überführt. Die Analyse der Proben erfolgte am FACS-Gerät. Als Kontrollen dienten sowohl ungefärbte Zellen als auch Zellen, die nur mit Sekundärantikörper oder Isotypkontrollen behandelt wurden.

Neben der Untersuchung der Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche lässt sich mittels FACS-Analyse auch der Zellzyklus von Zellen zum Zeitpunkt des Versuchs analysieren. Hierfür wurden Zellen mittels 5 mM EDTA/PBS-Lösung von der Zellkulturschale abgelöst und bei 301 g für 3 min und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 70% Ethanol über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurden die fixierten Zellen abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Die Färbung der DNA erfolgte mit 20 µM Draq5 für 15 min. Anschließend erfolgte die Analyse des Zellzyklus mittels FACS-Messung.

2.2.2.9 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ermöglicht es, einzelne Strukturen und Proteine innerhalb und außerhalb von Zellen mittels Fluoreszenz-Farbstoffen und Lasermikroskopie sichtbar zu machen.

Zur Analyse der Lokalisation und Expression intrazellulärer Proteine mittels Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf 8-kämmerigen Objektträgern ausplattiert. Nach einer Stimulierung und dem Abschluss der gewünschten Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4% PFA für 10 min bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen unter Verwendung einer Permeabilisierungslösung (0,1% Triton-X-100 und 1% BSA) für 10 min bei RT permeabilisiert, um intrazelluläre Proteine später durch entsprechende Antikörper detektieren zu können. Zur vollständigen Entfernung der Permeabilisierungslösung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen mit einer Blockierlösung (10% Ziegen Serum und 1%

BSA) für 1 h bei RT inkubiert. Die Lösung wurde dann abgesaugt und der Primärantikörper in der gewünschten Verdünnung in Blockierlösung aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Zugabe des passenden, mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte in gewünschter Verdünnung in Blockierlösung. Eine Kernfärbung wurde mit 2 µg/ml DAPI und 10 µM Draq5 durchgeführt. Diese Inkubation erfolgte für 60 min bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Objektträger mit Deckgläsern und PVA eingedeckelt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Lasermikroskopie.

2.2.3 Methoden zur Produktion und Analyse von Zuckermolekülen

2.2.3.1 Verdau von hochmolekularer Hyaluronsäure

Hochmolekulare Hyaluronsäure (HMW-HA) wurde entweder mit einer Hyaluronidase aus Rinderhoden (BTH) oder dem Bakterium *Streptomyces hyalurolyticus* verdaut.

Zur Gewinnung von Hyaluronsäurefragmenten (sHA) wurden 41,4 mg Healon in 0,3 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 5,35 aufgenommen. Zur Verringerung der Viskosität und zur Erleichterung des enzymatischen Verdaus wurde die HMW-HA-Lösung mehrmals sonifiziert. Bei einem Verdau mit BTH wurde das Enzym in einer Konzentration von 200 U/ml eingesetzt und der Ansatz für 6 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Das Abstoppen des Verdaus erfolgte durch einen Hitzeschock für 15 min bei 95 °C. Der Verdau kann anschließend für kurze Zeit bei 4 °C gelagert werden, bei längeren Lagerungen sollte er bei -20 °C aufbewahrt werden.

Ein Verdau mit der bakteriellen Hyaluronidase aus *Streptomyces hyalurolyticus* (1 U/µl) erfolgte in 0,02 M Natriumacetatpuffer pH 6,0 für 6 h bei 60 °C. Die Reaktion wurde durch Erhitzen für 15 min auf 95 °C abgestoppt.

2.2.3.2 Auftrennung von Hyaluronsäurefragmenten mittels Gelchromatographie

Zur Größenauftrennung des HMW-Verdaus wurde eine Säulengelchromatographie durchgeführt. Dieses Verfahren basiert darauf, dass kleine HA-Fragmente in den Einbuchtungen des Säulenmaterials zurückgehalten werden, während größere Fragmente die Säule schneller passieren können. Durch Fraktionierung können somit sHA-Moleküle unterschiedlicher Größe voneinander separiert werden.

Als Säulenmaterial wurde das BioGel P-10 fine von BioRad verwendet. Nach einer Rehydrierung über Nacht wurde das Säulenmaterial mit 0,3 M Natriumphosphat-Puffer pH 5,35 gewaschen und anschließend für mehrere Stunden entgast. Anschließend wurde das Säulenmaterial in die Säule gegossen und vor dem Gebrauch mit Puffer gewaschen. Schließlich wurde der HMW-HA-Verdau auf die Säule aufgetragen und mit Hilfe eines Fraktionensammlers fraktioniert.

2.2.3.3 Bestimmen der Hyaluronsäurekonzentration in gesammelten Fraktionen

Zur Bestimmung der sHA-Konzentration in den einzelnen Fraktionen wurde die optische Dichte (OD) bei $\lambda = 210$ nm gemessen. Als Standard diente HMW-HA.

2.2.3.4 Bestimmung der Größe von Zuckermolekülen mittels FACE-Analyse

Bei der FACE-Analyse (Fluorophorgestützte Kohlenhydratelektrophorese) handelt es sich um eine spezielle Form der Gelelektrophorese. Dabei wird sHA durch eine chemische Kopplungsreaktion zuerst mit dem Fluorophor 7-Amino-1,3-naphthalendisulfonsäure (ANDS) am reduzierenden Ende markiert und kann später mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden.

sHA und HA müssen vor der Analyse zuerst im Vakuumverdampfer für 2 h verdampft werden, um eine Verringerung des Volumens zu erzielen. Anschließend wurden die Proben in jeweils 5 μ l 0,15 M ANDS- und NACNBH₄-Lösung versetzt und die Kopplungsreaktion für 16 h bei 37 °C durchgeführt. Danach wurden die Proben unter Vakuum für 1-2 h getrocknet und in 20 μ l FACE-Gel Probenpuffer aufgenommen.

Das für die FACE-Analyse verwendete Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Der 10 ml Ansatz für das Trenngel setzte sich aus 0,625 ml H₂O, 8,125 ml 40% Acrylamid, 1,25 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 30 μ l 10% APS und 10 μ l TEMED zusammen. Der 4 ml Ansatz für das Sammelgel bestand aus 2,7 ml H₂O, 0,8 ml 30% Acrylamid, 0,5 ml 1 M Tris pH 6,8, 20 μ l 10% APS und 5 μ l TEMED.

Die Probentaschen wurden mit FACE-Gel-Laufpuffer gespült und die Proben aufgetragen. Anschließend wurde die Gelkammer mit kaltem Laufpuffer gefüllt und die Elektrophorese zuerst für 2 h bei 250 V durchgeführt, um eine einheitliche Lauffront der Proben zu bilden. Danach wurde die Elektrophorese bei 4 °C für 6 h bei 300 V fortgesetzt. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert. Als Marker dienten Fraktionen mit sHA-Molekülen definierter Größe.

2.2.3.5 Bestimmen der Hyaluronsäurekonzentration in murinen Tumoren

Zur Gewinnung interstitieller Tumorflüssigkeit (TIF) wurden Tumore zunächst zerkleinert. Mittels mehrerer Zentrifugationsschritte für 60 min bei 1841 g und 4 °C über einen 40 µm Nylon-Filter konnte die Tumorflüssigkeit gewonnen werden. Die TIF wurde nun auf einen 10 kDa Amicon-Filter aufgetragen und für 60 min bei 17949 g bei 4 °C zentrifugiert. HA-Fragmente kleiner als 26 Disaccharideinheiten (Ds) können den Filter passieren, größere Fragmente werden durch den Filter zurückgehalten. Die Konzentration der HA wurde mittels eines HA-ELISA-Kits (Echelon) nach den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

2.2.3.6 Aufbereitung der Hyaluronsäurefragmente für experimentellen Einsatz

sHA wurde generell bei -20 °C in 0,3 M-Natriumphosphat-Puffer pH 5,35 gelagert. Vor der experimentellen Verwendung wurde die sHA gefällt. Hierfür wurde das 4-fache Volumen an 100%igem Ethanol hinzugegeben und mindestens für 1 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 10621 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das sHA-Pellet unter der Sterilbank über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurde das Pellet im benötigten Volumen Medium resuspendiert.

2.2.4 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C, 5% CO₂, 21% O₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei primären humanen Lymphendothelzellen (LECs), humanen Perizyten (PCs), humanen glatten Muskelzellen (SMCs) und humanen mesenchymalen Stromazellen (MSCs) erfolgte die Kultivierung unter einer 5%igen O₂-Atmosphäre. Kultivierte LECs wurden regelmäßig auf die Expression spezifischer Marker kontrolliert.

2.2.4.1 Passagieren von Zellen

Der Zustand und die Dichte der Zellen wurden regelmäßig unter einem Mikroskop beobachtet. Zum Splitten von Tumorzellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, und die Zellen durch Inkubation mit vorgewärmtem Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden von dem Kulturgefäß abgespült, in ein Röhrchen überführt und für 3 min bei 301 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in der gewünschten Zelldichte in neue Kulturgefäße ausplattiert.

Bei dem Passagieren der LECs musste darauf geachtet werden, dass diese stets bei einer Konfluenz zwischen 70-80% gesplittet werden. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die

Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit PBS/Trypsin/5 mM EDTA versetzt. Das Ablösen der Zellen wurde sorgfältig unter dem Lichtmikroskop beobachtet und die Zellen durch vorsichtiges Abspülen mit Medium von dem Kulturgefäß entfernt. Die LECs wurden anschließend für 3 min bei 301 g abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und in der gewünschten Zelldichte ausplattiert.

2.2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die verwendeten Tumorzellen wurden nach dem Ablösen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in Einfriermedium (DMEM-Medium, 10% FCS, 1% Penicillin und 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in Einfriereröhrchen überführt und bei -80 °C oder langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert. LECs wurden in einem speziellen Medium eingefroren (FCS + 10% DMSO) und dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Die aufgetaute Zellsuspension wurde schnellstmöglich in 10 ml frisches Medium überführt, für 3 min bei 301 g abzentrifugiert und in frisches Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen in ein Kulturgefäß ausgesät. Bei den empfindlicheren LECs wurde auf die Zentrifugation verzichtet und das DMSO-haltige Medium am nächsten Tag durch frisches Medium ersetzt.

2.2.4.3 Bestimmen der Zellzahl

Die Zellzahl einer Suspension wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer und eines Lichtmikroskops bestimmt. 50 µl der zu bestimmenden Zellsuspension wurden zur Bestimmung des Anteils toter Zellen mit 50 µl Trypan-Blau gemischt und zwischen die Zählkammer und einem Deckglas aufgetragen. Es wurden fünf innere vertikal verlaufende Kästchen ausgezählt und der erhaltene Wert mit 1×10^5 multipliziert. Alternativ können auch 4×16 Kleinquadrate ausgezählt und der Wert mit 2×10^4 multipliziert werden.

2.2.5 Zellkulturexperimente zur Funktionsanalyse von sHA im Prozess der Lymphangiogenese

2.2.5.1 ³H-Thymidin-Inkorporationsassay

Mit Hilfe des ³H-Thymidin-Inkorporationsassays wurde die Proliferation von LECs *in vitro* bestimmt. Der Assay basiert auf der Fähigkeit proliferierender Zellen, ³H-gelabeltes Thymidin in ihre DNA einzubauen. Je stärker die Zellen proliferieren, desto mehr ³H-

Thymidin wird in ihre DNA eingebaut. Dies bedeutet, dass eine hohe gemessene β -Strahlung mit einer erhöhten Proliferation der Zellen korreliert.

Der Assay wurde stets in einer 96-well Platte durchgeführt. Die LECs wurden in einer Dichte von 1000 Zellen/well ausgesät und am nächsten Tag durch Zugabe von 50 μ l Hungermedium (EBM-2-Medium; 1% Penicillin/Streptomycin)/well für 16 h gehungert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und durch frisches FCS-haltiges Kulturmedium und einen entsprechenden Stimulus ersetzt. Bei einer Behandlung mit blockierenden Antikörpern oder Inhibitoren wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C mit diesen inkubiert und anschließend mit den Stimuli behandelt. Als Kontrolle dienten unstimulierte LECs, die mit Lösungsmittel, Isotypkontrollen oder HMW-HA behandelt wurden. Nach einer Inkubation von weiteren 72 h wurde in jede Probe 1 μ Ci 3 H-Thymidin pipettiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin für 30 min bei 37 °C behandelt. Die LECs wurden mit einem Erntegerät auf eine Filtermatte übertragen, wobei sie zerstört und ihre 3 H-Thymidin markierte DNA auf der Matte zurückgehalten wurde. Die durch das 3 H emittierte β -Strahlung wurde mittels Zugabe einer Sentilisationsflüssigkeit und eines β -Zählers gemessen und quantifiziert.

2.2.5.2 Migrationsassay

Hier sollte untersucht werden, inwiefern sHA die Migration von LECs beeinflusst. Bei diesem Migrationsassay handelt es sich um einen sogenannten „monolayer assay“, bei dem zwei konfluente Zellschichten durch einen künstlich erzeugten Spalt voneinander getrennt sind. Mittels Mikroskopie wurde die Fähigkeit der Zellen beobachtet, diesen Spalt zu schließen.

Der Assay wurde im 12-well-Format durchgeführt. Zur künstlichen Herstellung zweier durch einen Spalt getrennten konfluenten Schichten von LECs wurden spezielle zweikammrige Inserts verwendet. In die beiden Kammern eines Inserts wurden 70 μ l einer 7×10^5 Zellen/ml-Zellsuspension pipettiert. In die äußeren Areale wurden 20.000 Zellen/cm² pipettiert, um eine optimierte Kultivierung der LECs zu gewährleisten. Wichtig bei diesem Assay ist es, eine 100% konfluente Zellschicht zu erhalten.

Nach 24 h wurden nochmals 25 μ l frisches Medium zu jeder Hälfte des Inserts gegeben. Am nächsten Tag wurde das Insert vorsichtig entfernt, die Zellrasen zweimal gründlich mit PBS gewaschen und sHA bzw. HMW-HA in der gewünschten Konzentration in Medium hinzugegeben.

Die Migration der Zellen wurde mittels Time-Lapse-Mikroskopie an einem Axiovert 200M fluo-Mikroskop dokumentiert, wobei jede Stunde Fotos geschossen wurden. Die Bestimmung der Migrationsrate erfolgte durch die AxioVision 4.7-Software.

2.2.5.3 Gefäßbildung auf Matrigel

Endothelzellen verfügen *in vitro* über die Fähigkeit, gefäßartige Strukturen zu bilden. In diesem Assay sollte untersucht werden, ob bzw. wie sHA diese Fähigkeit beeinflusst. Der Assay wurde im 24-well Format auf einer Matrigel-Matrix durchgeführt.

Pro well wurden 400 µl einer Matrigellösung (3 mg/ml) pipettiert, die über Nacht bei 37 °C auspolymerisierte. Am nächsten Tag wurde das Matrigel mit PBS gewaschen und pro well 2 x 10⁵ LECs ausplattiert. Die Zellen wurden dann mit sHA bzw. HMW-HA in der gewünschten Konzentration behandelt und die Ausbildung gefäßartiger Strukturen wurde fotografisch dokumentiert. Zur Quantifizierung wurden die Verzweigungspunkte zwischen den sich gebildeten Strukturen ausgezählt.

2.2.5.4 Untersuchung der durch Hyaluronsäurefragmente in LECs induzierten Signalwege

Zur Untersuchung der Wirkung von sHA auf die Aktivierung bzw. Hemmung von zellulären Signalwegen in LECs wurde eine Reihe von Zeitreihen durchgeführt. LECs wurden für unterschiedlich lange Zeiträume mit verschiedenen Konzentrationen an sHA inkubiert, Lysate hergestellt und die Regulation von Signalmolekülen mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht.

2.2.5.5 Untersuchung der Wirkung von Hyaluronsäurefragmenten und TGF-β auf die Expression lymphatischer Marker

LECs wurden für 24, 48, 72 oder 96 h mit sHA oder für 24, 48, 72, 80 und 100 h mit TGF-β-1, -2 oder -3 inkubiert, die Proteine im Überstand mit Strataclean-Beads aufkonzentriert und die Zellen mit Proben-Puffer lysiert. Bei einer Behandlung mit blockierenden Antikörpern wurden diese für 1 h bei 37 °C vor der Zugabe von sHA hinzugegeben. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Der Nachweis einer Prox-1-Expression erfolgte zusätzlich mittels Immunfluoreszenz und erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.9 beschrieben.

2.2.6 Tumorexperimente

2.2.6.1 Injektion von murinen 4T1-Tumorzellen und Entnahme von Organen

In 2-3 Monate alte Balb/c Wildtyp- und LYVE-1-KO-Mäuse wurden je 1×10^6 metastasierende 4T1-Zellen subkutan implantiert.

Die Tumore wurden regelmäßig vermessen und das Volumen berechnet. Erreichte der Tumor eine Größe von 2 cm in einer Dimension wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und der Primärtumor entnommen. Ein Teil des Primärtumors wurde für eine spätere RNA-Isolation bei -80 °C eingefroren, ein anderer Teil wurde in Einbettmedium für spätere histologische Analysen aufbewahrt. Aus dem Großteil des Tumors wurde mittels Zentrifugation die interstitielle Flüssigkeit gewonnen, die später auf ihre sHA- und HMW-HA-Konzentration untersucht wurde (siehe 2.2.3.5). Zur Untersuchung des Metastasierungspotentials wurden die axillaren und inguinalen Lymphknoten entfernt, vermessen und eingebettet. Zusätzlich wurden die Lungen entnommen und die Anzahl der Metastasen mit Hilfe eines Binokular-Mikroskops bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Wirkung von sHA auf LECs *in vitro*

In mehreren Studien konnten Effekte von sHA *in vitro* und *in vivo* auf die Proliferation und Migration verschiedenster Zelltypen bereits nachgewiesen werden (West und Kumar, 1989; Montesano et al., 1996; Rahmanian et al., 1997; Cui et al., 2009; Perng et al., 2011). Die Wirkung von sHA auf die Lymphangiogenese wurde bislang jedoch nicht analysiert und sollte in den folgenden Experimenten näher untersucht werden.

3.1.1 Herstellung und Analyse von Hyaluronsäurefragmenten (sHA)

Um die Wirkung von sHA auf das Verhalten von LECs untersuchen zu können, wurden zunächst HA-Fragmente enzymatisch hergestellt. Dazu wurde eine Säuger-Hyaluronidase aus Rinderhoden (BTH) und eine Hyaluronidase aus *Streptomyces hyalurolyticus* verwendet. BTH spaltet HMW-HA wie humane Hyaluronidasen an β -1,4-glykosidischen Bindungen. Die bakterielle Hyaluronidase spaltet β -1,3-glykosidische Bindungen. Durch den Einsatz dieser beiden unterschiedlich agierenden Enzyme war es möglich, sHA mit N-Acetylglucosamin bzw. Glucuronsäure am reduzierenden Ende zu produzieren und auch den potentiellen Effekt dieser unterschiedlichen Endstrukturen auf das Verhalten der LECs zu untersuchen.

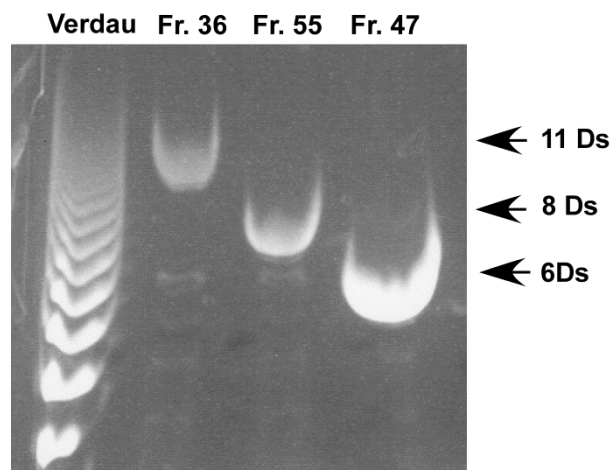


Abbildung 1: Größenbestimmung von Hyaluronsäurefragmenten mittels FACE-Analyse.

Hochmolekulare Hyaluronsäure wurde mit Hyaluronidase aus Rinderhoden (BTH) verdaut und gelchromatographisch aufgetrennt. Hyaluronsäurefragmente aus verschiedenen Fraktionen (36 und 47) und zuvor bereits erfolgreich verdaute HA wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff ANDS gekoppelt und mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (FACE-Analyse) aufgetrennt. Die Größenordnung erfolgte durch die Verwendung eines zuvor etablierten Markers, hier vertreten durch Fraktion 55 mit sHA einer Größe von 8 Ds.

Nach Sonifizierung und dem enzymatischen Verdau der HMW-HA wurden die entsprechenden Ansätze auf eine Säule aufgetragen und mittels Gelchromatographie größenabhängig fraktioniert. Hierbei werden große Fragmente zuerst, kleinere sHA-Moleküle später eluiert. Danach wurde die Konzentration der Fraktionen photometrisch bestimmt, und die Größe der sHA mittels ANDS-Kopplung und FACE-Analyse bestimmt (Abbildung 1).

3.1.2 sHA vermittelt einen biphasischen Effekt auf die Proliferation von LECs

Um einen möglichen Effekt von sHA auf die Proliferation von LECs zu untersuchen, wurden primäre humane LECs für 96 h mit sHA behandelt. Dabei wurden sowohl unterschiedliche sHA-Konzentrationen und -Größen als auch sHA-Moleküle verwendet, die mittels BTH oder der bakteriellen Hyaluronidase aus *Streptomyces hyalurolyticus* aus HMW-HA generiert wurden. Auf diese Weise sollte sowohl eine mögliche Größen- und Konzentrationsabhängigkeit als auch der Einfluss der chemischen Struktur des reduzierenden Endes auf die Proliferation der LECs erfasst werden. Zur Quantifizierung wurde der Einbau von ³H-markierter DNA in proliferierende Zellen gemessen.

Dabei zeigte sich, dass sHA aus einem BTH-HA-Verdau einen biphasischen Effekt auf die Proliferation von LECs hat. sHA-Moleküle einer Größe von 4-13 Ds und in einem Konzentrationsbereich von 1-10 µg/ml besaßen eine pro-proliferative Wirkung auf die LECs, während 3 Ds und HMW-HA keinen Effekt vermittelten (Abbildung 2A). Außerdem konnte zusätzlich ein anti-proliferativer Effekt bei hohen sHA-Konzentrationen ab 20 µg/ml festgestellt werden (Abbildung 2A).

Wie die sHA aus einem HA-Verdau mit BTH induzieren auch durch bakterielle Hyaluronidase generierten sHA-Moleküle einen biphasischen Effekt auf die Proliferation der LECs (Abbildung 2B). Bei niedrigen sHA-Konzentrationen konnte eine pro-proliferative Wirkung beobachtet werden, während speziell bei den 4-7 Ds großen sHA-Molekülen bei Konzentrationen ab 20 µg/ml eine deutliche inhibitorische Wirkung zu erkennen war (Abbildung 2B). Dies spricht dafür, dass die unterschiedliche chemische Struktur des reduzierenden Endes der sHA-Moleküle keinen Einfluss auf deren pro- und anti-proliferativen Effekte besitzt.

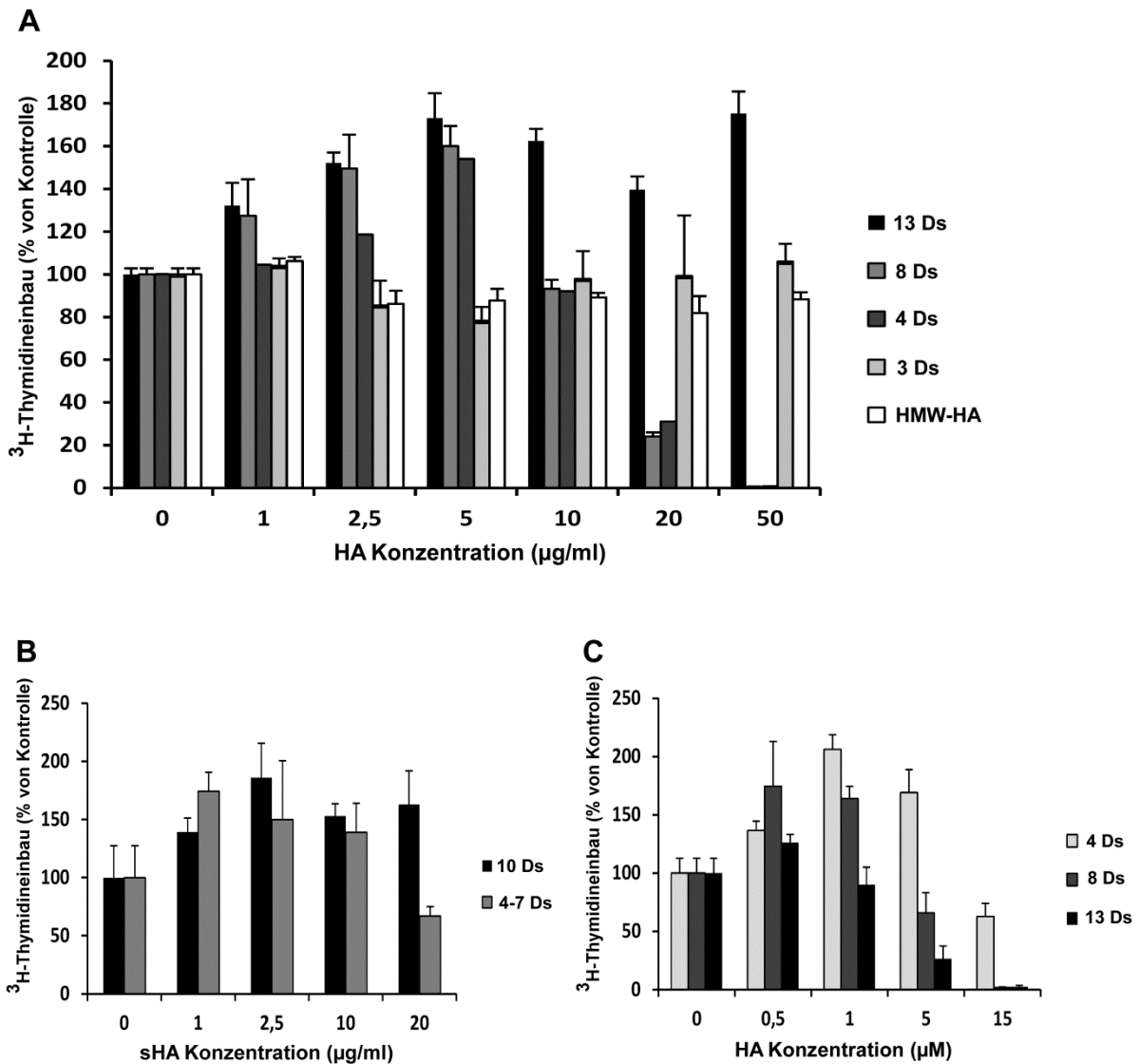


Abbildung 2: Hyaluronsäurefragmente vermitteln einen größen- und konzentrationsabhängigen biphasischen Effekt auf die Proliferation von primären humanen LECs.

Primäre humane LECs wurden für 96 h mit verschiedenen Konzentrationen und Größen von sHA behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und HMW-HA. Nach 72 h wurde zu den LECs 1µCi ³H-Thymidin gegeben und nach weiteren 24 h wurden die Proben geerntet und die β-Strahlung gemessen. (A) LECs wurden mit verschiedenen großen sHA-Fragmenten eines Verdau mit BTH oder unverdauter HMW-HA behandelt. Als Konzentrationen wurden 1, 2,5, 5, 10, 20 und 50 µg/ml eingesetzt. (B) LECs wurden mit sHA-Molekülen aus verschiedenen Fraktionen eines HA-Verdau mit bakterieller Hyaluronidase aus *Streptomyces hyalurolyticus* behandelt. Als Konzentrationen dienten 1, 2,5, 10 und 20 µg/ml. (C) LECs wurden mit equimolaren Konzentrationen (0,5, 1, 5, und 15 µM) von sHA aus einem Verdau mit BTH inkubiert. Alle Proben wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Durch den Einsatz equimolarer Konzentrationen sollte getestet werden, welche sHA-Fragmente den stärksten Einfluss auf die Proliferation der LECs besitzen. Es stellte sich heraus, dass kleine sHA-Moleküle einen deutlich stärkeren pro-proliferativen Effekt hervorrufen als größere HA-Fragmente (Abbildung 2C). Außerdem ist sowohl bei kleinen als

auch bei großen sHA-Molekülen ein anti-proliferativer Effekt bei hohen Konzentrationen zu beobachten (Abbildung 2C).

Aufgrund der starken pro-proliferativen Eigenschaften der kleineren sHA-Moleküle wurden für die weiteren Versuche sHA einer Größe von 4-10 Ds verwendet.

3.1.3 sHA hemmt die Migration von LECs *in vitro*

sHA kann die Migration von Blutendothelzellen stimulieren (Sattar et al., 1994; Gao et al., 2008). Im Folgenden sollte die Wirkung von sHA auf das Migrationsverhalten humaner LECs *in vitro* untersucht werden. Hierfür wurde ein sogenannter „Monolayer assay“ durchgeführt. Dabei werden zwei konfluente Zellpopulationen durch einen künstlich hergestellten Spalt voneinander getrennt. LECs wurden für 12 h, 24 h und 36 h mit sHA bzw. HMW-HA behandelt und die Auswirkung dieser Behandlung auf das Schließen des Spaltes wurde untersucht.

Im Gegensatz zu HMW-HA und niedrigen sHA-Konzentrationen hemmen hohe sHA-Konzentrationen die Migration von LECs *in vitro* signifikant (Abbildung 3). Dies spricht für eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Migration durch sHA.

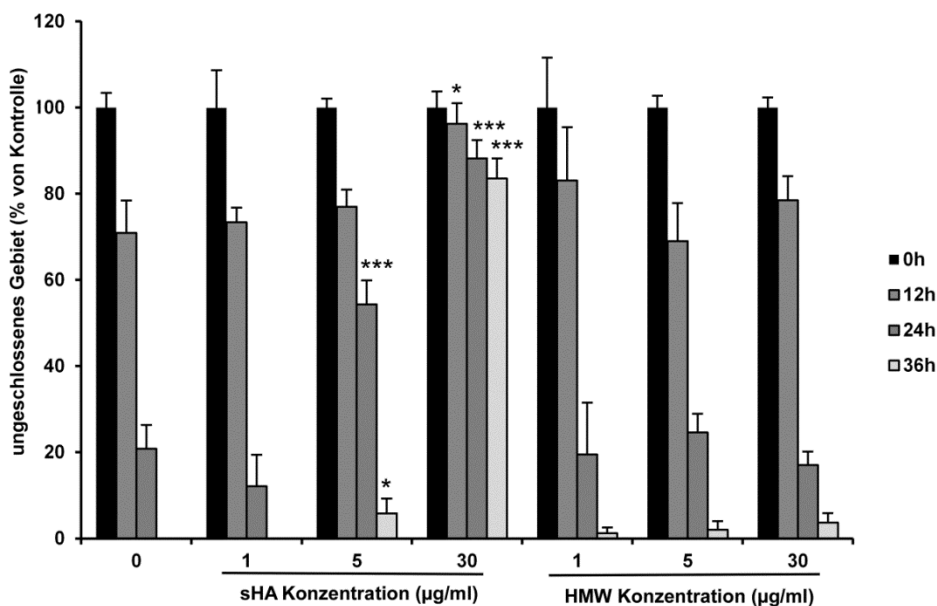


Abbildung 3: Hohe sHA-Konzentrationen hemmen die Migration von LECs *in vitro*.

Humane LECs wurden für 12, 24 und 36 h mit sHA oder HMW-HA (1, 5 und 30 µg/ml) behandelt. Das Schließen des zuvor künstlich hergestellten Spaltes zwischen den LECs wurde photographisch dokumentiert. Der prozentuale Anteil des ungeschlossenen Areals wurde quantifiziert. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$.

3.1.4 sHA inhibiert die Gefäßbildung von LECs konzentrationsabhängig

sHA kann die Ausbildung von Gefäßstrukturen durch Blutendothelzellen fördern (Rahmanian et al., 1997; Matou-Nasri et al., 2009). Hier sollte nun untersucht werden, ob sHA auch die Gefäßbildung von LECs beeinflusst. Dafür wurden in einem 2D Tubule-formation-Assay LECs auf einer Matrigelmatrix ausgesät, mit verschiedenen sHA-Konzentrationen behandelt und die Ausbildung von Gefäßstrukturen dokumentiert.

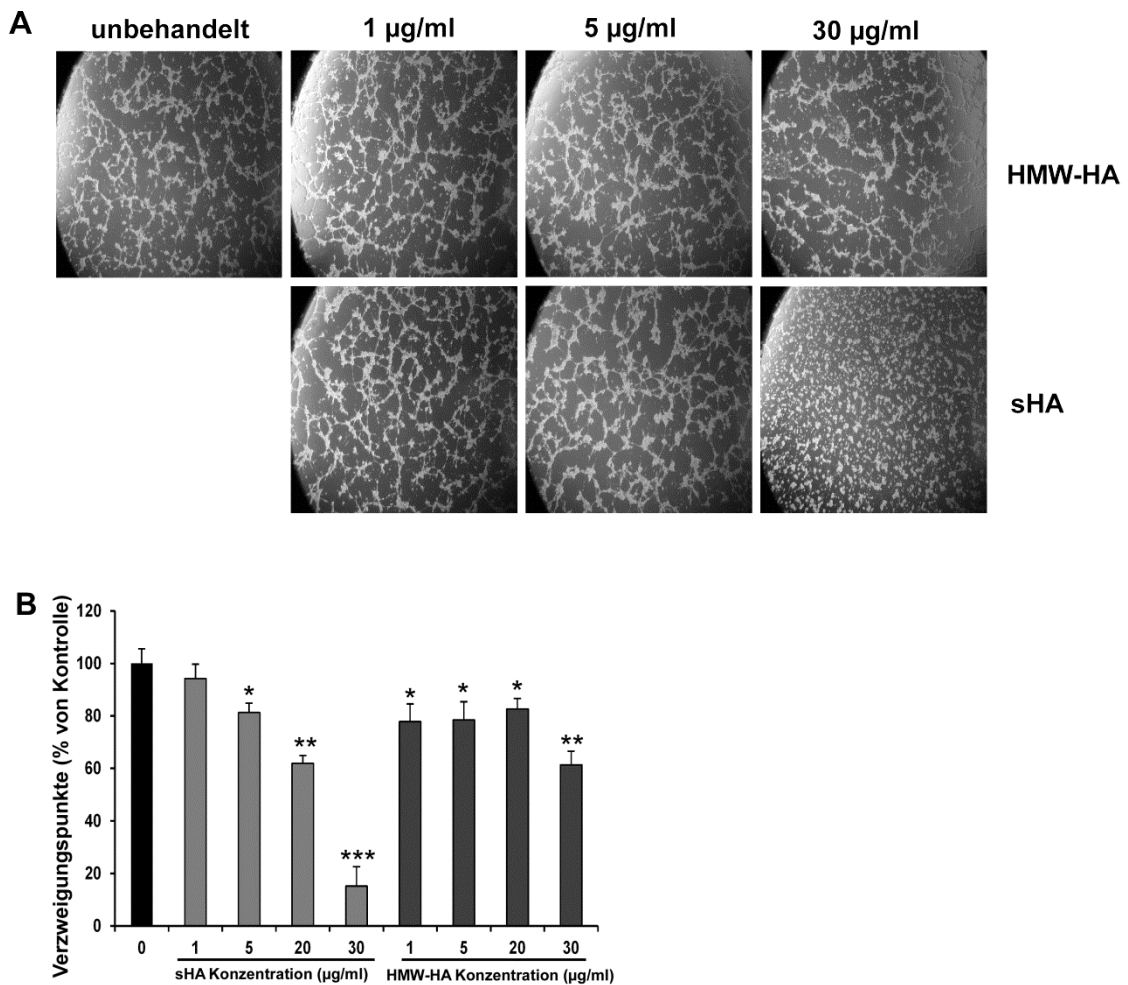


Abbildung 4: sHA-Moleküle vermitteln einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt auf die Bildung gefäßartiger Strukturen durch LECs *in vitro*.

2D Tubule-formation-Assay zur Untersuchung des Effekts von sHA und HMW-HA auf die Gefäßbildung von LECs *in vitro*. Auf einer Matrigelmatrix ausplattierte LECs wurden für 5-7 h mit sHA und HMW-HA behandelt (1, 5, 20 und 30 µg/ml). Die Ausbildung der gefäßartigen Strukturen wurde photographisch dokumentiert. Zur Quantifizierung wurden die Verzweigungspunkte zwischen den gebildeten Strukturen ausgezählt. (A) Mit steigenden sHA-Konzentrationen ist eine deutliche Abnahme der Gefäßstrukturen zu erkennen, wobei der Effekt von HMW-HA deutlich geringer ausfällt. (B) Die Quantifizierung zeigt einen deutlichen signifikanten konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt von sHA auf die Gefäßbildung von LECs auf Matrigel. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Bei steigenden sHA-Konzentrationen war eine deutliche Abnahme der Ausbildung gefäßartiger Strukturen zu beobachten (Abbildung 4A und 4B). Eine Quantifizierung der Verzweigungspunkte zwischen den neugebildeten Gefäßstrukturen zeigte, dass HMW-HA ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die LECs hat, diese jedoch deutlich schwächer ausfällt als der konzentrationsabhängige inhibitorische Effekt von sHA (Abbildung 4B).

3.1.5 Hohe sHA-Konzentrationen induzieren einen G1-Arrest in LECs

Offensichtlich beeinflusst sHA die Proliferation, Migration und die Ausbildung von Gefäßstrukturen von LECs größen- und konzentrationsabhängig. Diese Prozesse werden stark durch den Zellzyklus der LECs reguliert. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, wie sHA den Zellzyklus von LECs beeinflusst.

Zu diesem Zweck wurden LECs mit verschiedenen sHA-Konzentrationen behandelt, und die Verteilung der Zellen im Zellzyklus durchflusszytometrisch bestimmt.

Hohe sHA-Konzentrationen induzieren einen G1-Arrest in LECs, während niedrige Konzentrationen und HMW-HA keinen Einfluss besitzen (Abbildung 5). Der durch sHA induzierte G1-Arrest steht im Einklang mit dem bei hohen sHA-Konzentrationen beobachteten anti-proliferativen Effekt.

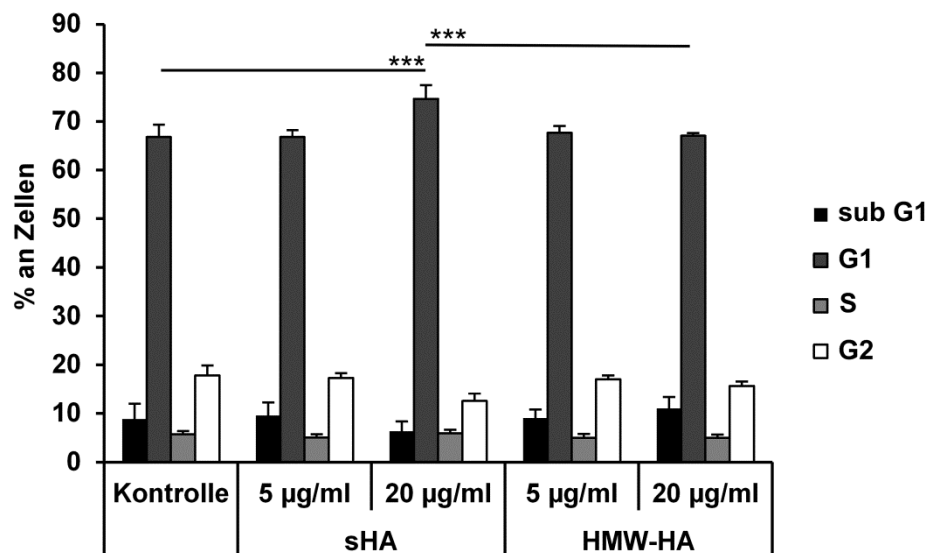


Abbildung 5: Hohe sHA-Konzentrationen induzieren einen G1-Arrest in LECs *in vitro*.

Primäre humane LECs wurden für 48 h mit 5 oder 20 µg/ml sHA oder HMW-HA behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte LECs. Die Zellzyklusverteilung der LECs wurde durchflusszytometrisch bestimmt und quantifiziert. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. *** = $p < 0,005$

3.1.6 sHA vermittelt einen additiven Effekt mit VEGF-C und FGF-2

Die Lymphangiogenese wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Zu den prominentesten pro-lymphangiogenen Faktoren zählen VEGF-C, FGF-2 und PDGF-BB (Jeltsch et al., 1997; Cao et al., 2004; Chang et al., 2004). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sHA möglicherweise zusammen mit VEGF-C, FGF-2 oder PDGF-BB einen additiven Effekt auf die Proliferation von LECs vermitteln. Dies könnte einen Aufschluss auf die Wirkungsweise von sHA bezüglich seiner pro-proliferativen Eigenschaften geben.

Zu diesem Zweck wurden LECs mit verschiedenen pro-lymphangiogenen Faktoren in Kombination mit sHA behandelt. Hierbei wurden suboptimale Konzentrationen eingesetzt, um additive oder synergistische Effekte registrieren zu können.

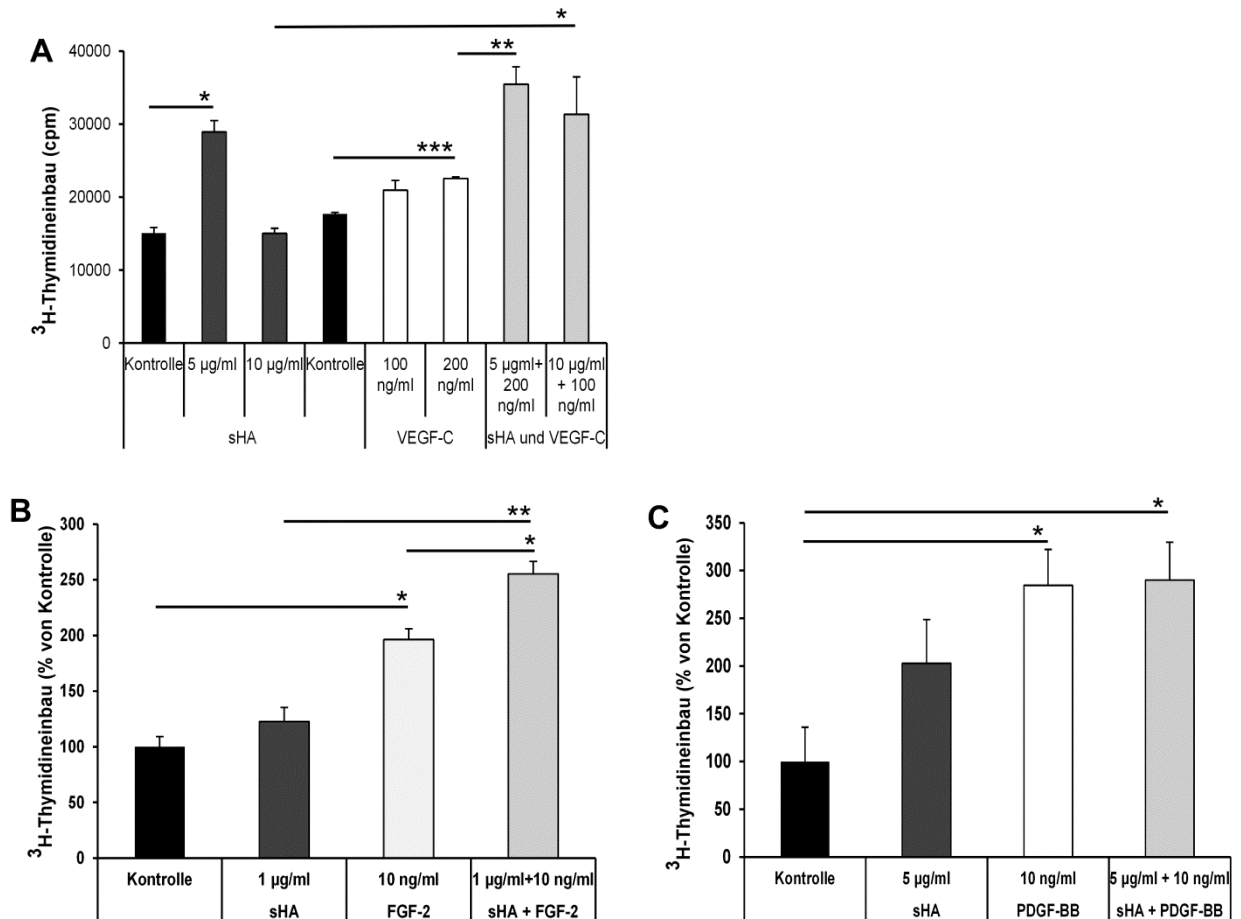


Abbildung 6: sHA vermittelt zusammen mit VEGF-C und FGF-2 einen additiven Effekt auf die Proliferation von primären humanen LECs.

Primäre humane LECs wurden für 96 h mit verschiedenen Konzentrationen von sHA und pro-lymphangiogenen Faktoren inkubiert. (A) Behandlung von LECs mit 5 bzw. 10 µg/ml sHA kombiniert mit einer Stimulation mit 100 bzw. 200 ng/ml VEGF-C. (B) Kombinierte Behandlung der LECs mit 1

$\mu\text{g/ml}$ sHA und 10 ng/ml FGF-2. (C) Stimulation von LECs mit $5 \mu\text{g/ml}$ sHA und 10 ng/ml PDGF-BB. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Eine kombinierte Stimulation von LECs mit sHA und VEGF-C bzw. FGF-2 vermittelt einen additiven Effekt auf die Proliferation primärer humaner LECs (Abbildung 6A und 6B). Im Gegensatz hierzu ist bei einer Behandlung der LECs mit sHA und PDGF-BB keine additive Wirkung der Stimuli zu erkennen (Abbildung 6C). Dies legt den Schluss nahe, dass sHA seine pro-proliferative Wirkung unabhängig von VEGF-C und FGF-2 vermittelt.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung des Rezeptors für sHA auf humanen LECs

Das Verhalten von LECs kann durch sHA in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden. In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, über welchen Rezeptor bzw. welche Rezeptoren diese Effekte vermittelt werden.

3.2.1 CD44, TLR-4 und LYVE-1 werden auf der Oberfläche von LECs exprimiert

Sowohl CD44, als auch TLR-4 können auf unterschiedlichen Zelltypen als sHA-Rezeptoren fungieren (Termeer et al., 2002; Taylor et al., 2004, 2007; Wang et al., 2011). Zur Bestimmung des potentiellen Rezeptors von sHA auf LECs wurde zunächst die Expression von CD44 und TLR-4 auf der Oberfläche von LECs mittels FACS-Messung analysiert. Aufgrund seiner hohen strukturellen Homologie zu CD44 und seiner möglichen Rolle in der HA-Bindung wurde außerdem die Expression von LYVE-1 auf LECs untersucht.

Die Expression von CD44, TLR-4 und LYVE-1 auf der Oberfläche der LECs konnte mittels FACS-Messung bestätigt werden (Abbildung 7).

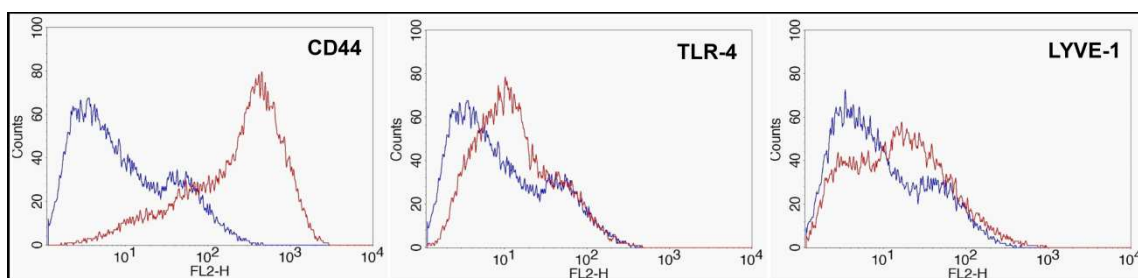


Abbildung 7: CD44, TLR-4 und LYVE-1 sind auf der Oberfläche humaner LECs exprimiert.

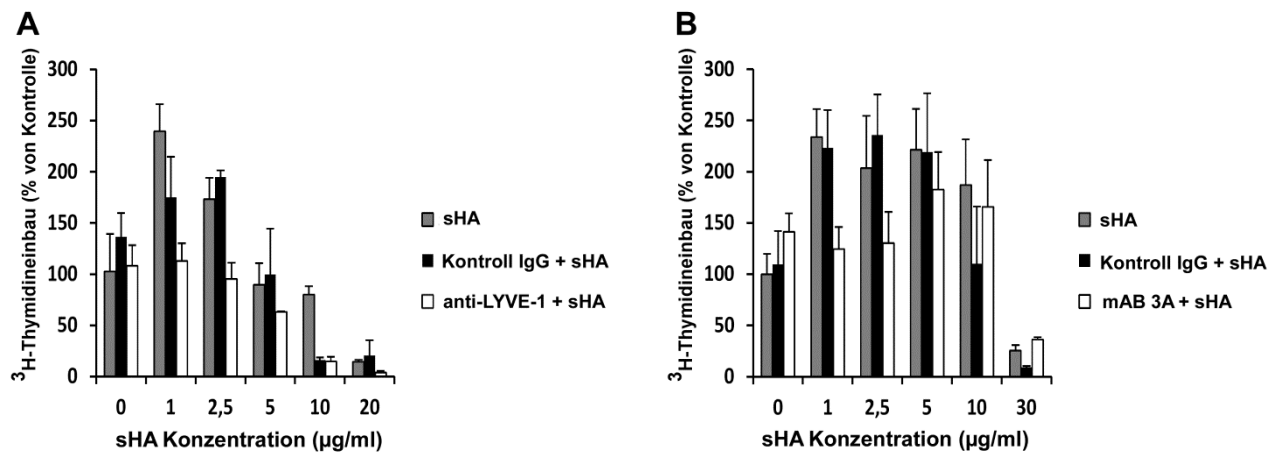
Primäre humane LECs wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CD44, TLR-4 und LYVE-1 gefärbt, und die Expression der Oberflächenmoleküle mittels FACS-Messung untersucht.

3.2.2 LYVE-1 vermittelt den pro-proliferativen Effekt von sHA

Um den bzw. die Rezeptoren zu identifizieren, die für die sHA-vermittelten Effekte verantwortlich sind, wurden LECs mit entsprechenden Konzentrationen an sHA und spezifischen blockierenden Antikörpern gegen LYVE-1, CD44 und TLR-4 behandelt. Zudem kam der spezifische TLR-4-Signaltransduktionsinhibitor CLI-095 zum Einsatz.

Eine Blockade von LYVE-1 führte zu einer Aufhebung des pro-proliferativen Effekts niedriger sHA-Konzentrationen (Abbildung 8A und 8B). Allerdings wurde der inhibitorische Effekt hoher sHA-Konzentrationen nicht durch diese Blockade beeinflusst (Abbildung 8A und 8B).

Sowohl die Blockade der Rezeptoren CD44 und TLR-4 als auch die Inhibierung der TLR-4-Signaltransduktionskaskade durch CLI-095 hatten keinen Effekt auf die konzentrationsabhängige pro-proliferative oder inhibitorische Wirkung von sHA auf LECs (Abbildung 8C-8E). Somit vermittelt der lymphatische Marker LYVE-1 die pro-proliferative Wirkung von sHA auf LECs, während CD44 und TLR-4 an diesem Prozess offenbar nicht beteiligt sind.



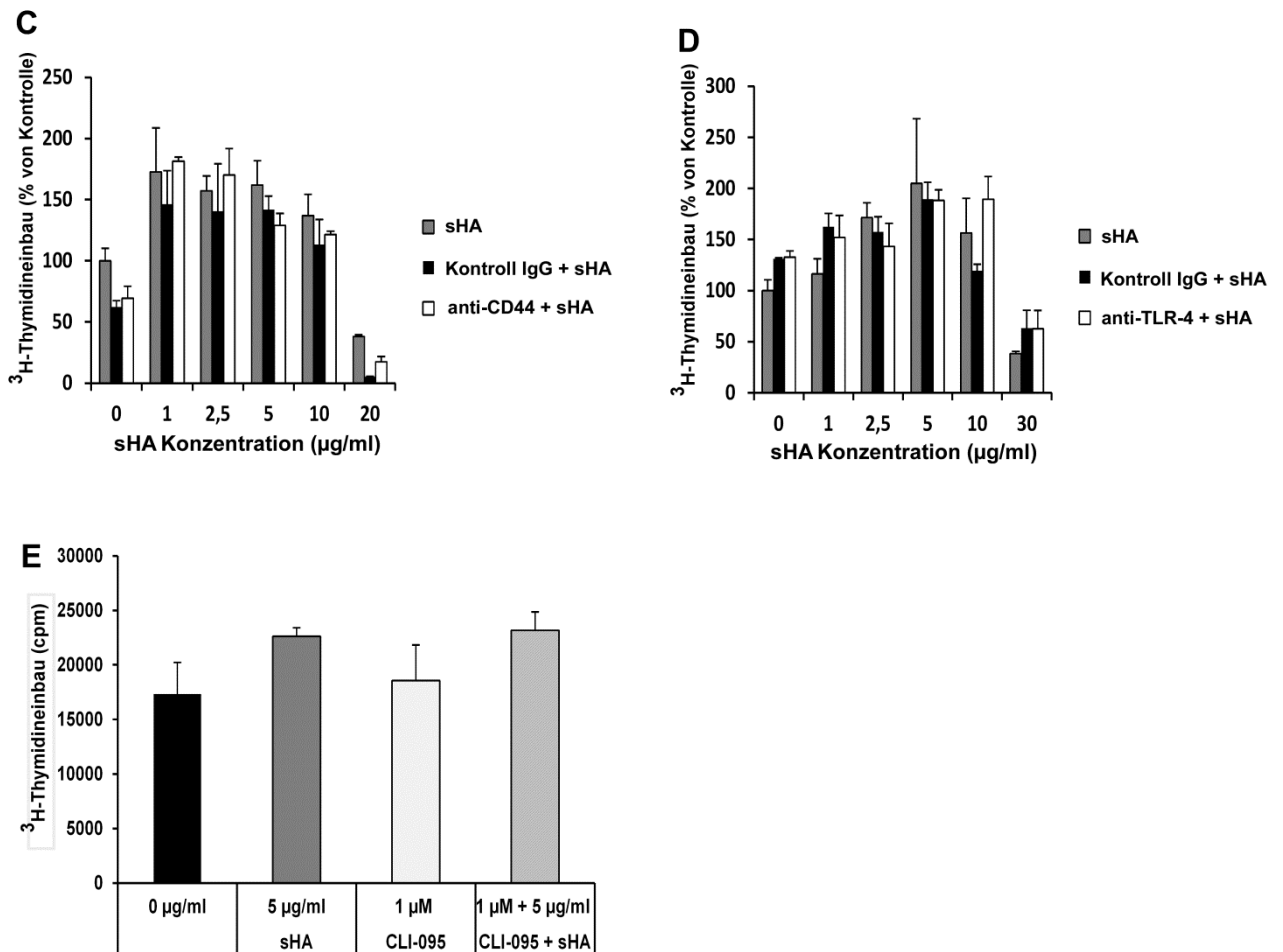


Abbildung 8: LYVE-1 vermittelt den pro-proliferativen Effekt niedriger sHA-Konzentrationen.

(A) LECs wurden mit blockierenden anti-LYVE-1-Antikörpern, einer entsprechenden Isotypkontrolle und sHA behandelt, und ihre Proliferation durch den Einbau von ³H-Thymidin analysiert. (B) LECs wurden mit monoklonalen LYVE-1 blockierenden mAB 3A-Antikörpern, einer entsprechenden Isotypkontrolle und sHA behandelt und ihre Proliferation mittels ³H-Thymidininkorporationsassays bestimmt. (C) LECs wurden mit blockierenden anti-CD44-Antikörpern, einer entsprechenden Isotypkontrolle und sHA behandelt, und ihre Proliferation durch den Einbau von ³H-Thymidin analysiert. (D) LECs wurden mit blockierenden anti-TLR-4-Antikörpern, einer entsprechenden Isotypkontrolle und sHA behandelt, und ihre Proliferation in ³H-Thymidininkorporationsassays bestimmt. (E) LECs wurden mit dem TLR-4 spezifischen Signaltransduktionsinhibitor CLI-095 und sHA behandelt, und ihre Proliferation durch den Einbau von ³H-Thymidin bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

3.2.3 Analyse des Sialisierungstatus von LYVE-1

Glykosilierungen spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung von Bindungen zwischen Rezeptoren und Liganden. LYVE-1 weist verschiedene Modifizierungen der extrazellulären Domäne mit Zuckermolekülen auf (Nightingale et al., 2009). Es handelt sich dabei vor allem um O-Glykosilierungen und Modifikationen mit Sialinsäureresten an der Stammregion von

LYVE-1 (Nightingale et al., 2009). Diese Sialisierung ist zelltypspezifisch und kann die Bindung von HMW-HA regulieren (Nightingale et al., 2009).

LYVE-1 wurde in Blockierungsversuchen als Mediator des pro-proliferativen Effekts von niedrigen sHA-Konzentrationen identifiziert (Abbildung 8A und 8B). Die Sialisierung von LYVE-1 könnte neben der Bindung von HMW-HA auch die Interaktion mit sHA beeinflussen. Aus diesem Grund wurde im Folgenden der Sialisierungsstatus von LYVE-1 auf LECs untersucht.

In einem ersten Versuch wurden LEC-Lysate mit dem Enzym Neuraminidase aus *Arthrobacter ureafaciens* inkubiert. Diese Neuraminidase ist in der Lage, spezifisch Sialinsäurereste abzuspalten. Nach der enzymatischen Reaktion wurde mit dem Lysat eine LYVE-1-Immunpräzipitation durchgeführt. Die Behandlung des LEC-Lysats mit Neuraminidase führte zu einer Reduktion der molekularen Masse von LYVE-1 im SDS-PAGE (Abbildung 9A), was dahingehend interpretiert werden kann, dass die Neuraminidase Sialinsäurereste von LYVE-1 abspaltet und sich somit das Molekulargewicht von LYVE-1 sichtbar verringert. Die Behandlung des LEC-Lysats mit Neuraminidase, gefolgt von einem Pull-down-Experiment mit sialinsäurespezifischen Lektinen aus *Maackia Amurensis* (MAA), führte im SDS-PAGE zu einem Verschwinden der LYVE-1-Bande, die in unbehandelten Lysaten detektierbar war (Abbildung 9B). Dies ist ein weiterer Beleg für die Sialisierung von LYVE-1. Um den Anteil an sialilierten LYVE-1-Molekülen an der Gesamtmenge von LYVE-1 auf den verwendeten LECs zu bestimmen, wurden LEC-Lysate mit Neuraminidase behandelt und ein Pull-down-Assay mit MAA-Lektinen und daran anschließend eine LYVE-1-IP durchgeführt (Abbildung 9C). Hierbei konnte gezeigt werden, dass offensichtlich alle der sichtbaren LYVE-1 Moleküle auf den LECs in sialisierter Form vorlagen (Abbildung 9C).

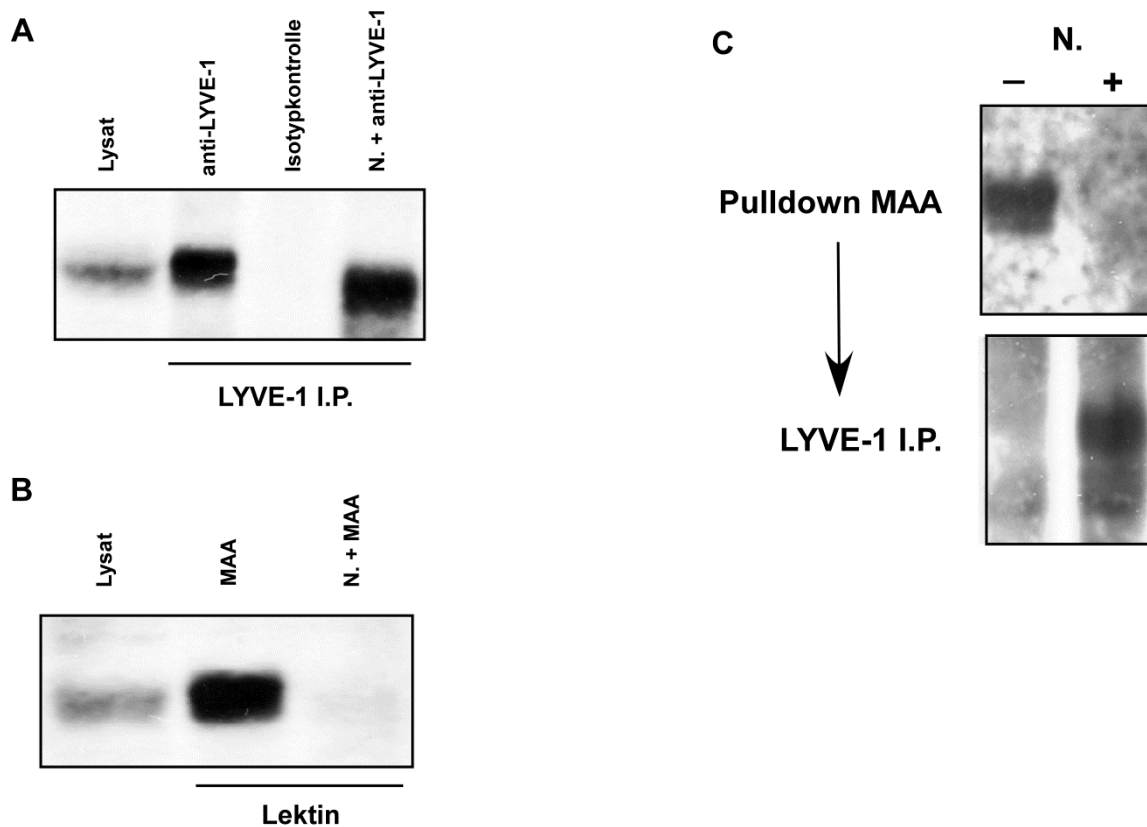


Abbildung 9: Das Gros der LYVE-1-Moleküle auf der Oberfläche von LECs ist sialisiert.

(A) Primäre humane LECs wurden lysiert und die Zellreste mit Neuraminidase aus *Arthrobacter ureafaciens* behandelt, oder blieben unbehandelt. Anschließend erfolgte eine LYVE-1-IP. Als Kontrolle dienten unbehandelte Lysate und Isotypkontrollantikörper. (B) LEC-Lysat wurde mit Neuraminidase behandelt. Danach erfolgte ein Pull-down Assay mit immobilisierten Lektinen aus *Maackia amurensis* (MAA) um spezifisch sialisierte Moleküle zu binden. Unbehandelte Lysate fungierten als Kontrolle (C) LEC-Lysate wurden mit Neuraminidase behandelt oder blieben unbehandelt. Nach einem durchgeführten MAA-Lektin Pull-down wurde der Überstand der Proben für eine LYVE-1-IP verwendet. Alle Proben wurden im SDS-PAGE und Western Blot mit LYVE-1 -spezifischen Antikörpern analysiert. (N. = Neuraminidase-Behandlung); (MAA = Behandlung mit immobilisierten MAA-Lektinen)

3.2.4 Auf LECs kann LYVE-1 nicht als Corezeptor für PDGF β R fungieren

Es wird berichtet, dass LYVE-1 durch eine Komplexbildung mit PDGF β R und β -Catenin an der Regulierung des lymphatischen Flusses beteiligt, wobei LYVE-1 als Corezeptor von PDGF β R fungiert (Boensch et al., 1999; Hou et al., 2011, 2012). Um zu überprüfen, ob LYVE-1 seine Funktion in der sHA-vermittelten Lymphangiogenese als Corezeptor von PDGF β R oder PDGF α R vermittelt, wurde die Expression dieser Rezeptoren auf RNA- und Proteinebene untersucht.

Weder PDGF β R noch PDGF α R werden auf der RNA- oder der Proteinebene von LECs exprimiert (Abbildung 10A und 10B). Somit kann eine Corezeptorfunktion von LYVE-1 für die PDGF-Rezeptoren auf den LECs ausgeschlossen werden. Dies bestätigt eine zentrale Rolle von LYVE-1 als Rezeptor in der sHA-vermittelten Lymphangiogenese.

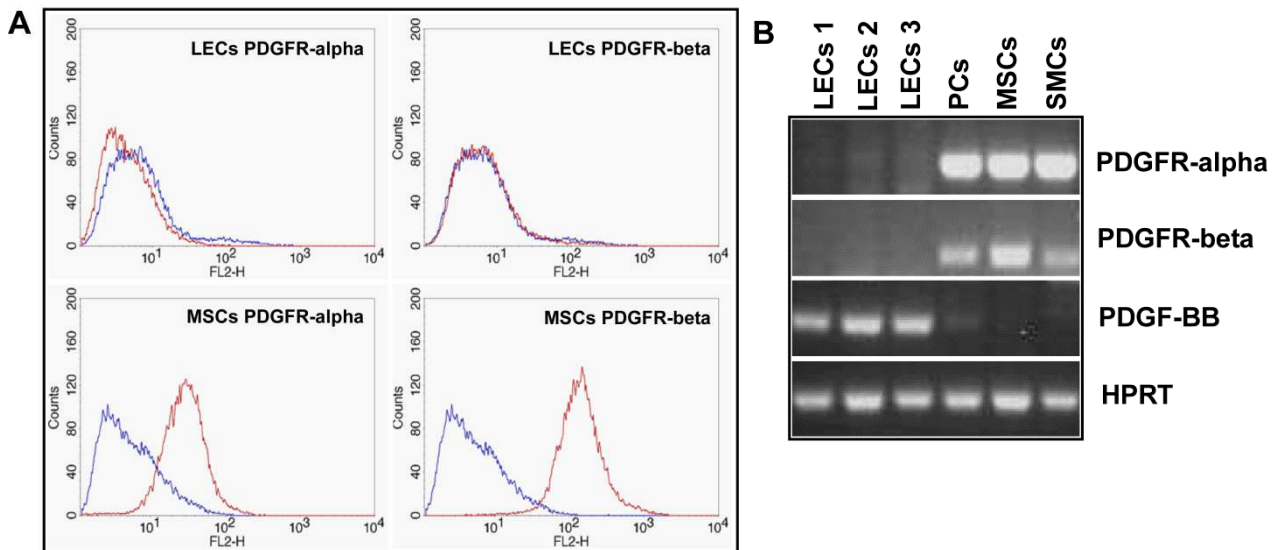


Abbildung 10: PDGF β R und PDGF α R werden weder auf Proteinebene noch auf RNA-Ebene in LECs exprimiert.

(A) Primäre humane LECs und mesenchymale Stromazellen (MSCs) wurden mit anti-PDGFR- bzw. PDGF β R-Antikörpern oder entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert. Die Expression der beiden Oberflächenrezeptoren wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. (B) Mittels RT-PCR wurde die Expression von PDGF α R, PDGF β R und PDGF-BB in drei verschiedenen Lots von LECs untersucht. Als Kontrolle dienten Perizyten (PCs), mesenchymale Stromazellen (MSCs) und glatte Muskelzellen (SMCs). HPRT fungierte als Ladekontrolle.

3.3 Untersuchung der molekularen Wirkungsweise niedriger sHA-Konzentrationen

In den zuvor durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass niedrige Konzentrationen von sHA in einem Bereich von 1-5 μ g/ml pro-proliferativ auf humane LECs wirken. Im Folgenden sollte das Augenmerk darauf gerichtet werden, welche molekularen Mechanismen und Signalwege diesen stimulatorischen Effekt von sHA vermitteln.

3.3.1 Der pro-proliferative Effekt von sHA ist unabhängig von IL-6

Das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-6 (IL-6) reguliert neben Immunprozessen auch Angiogenese und Lymphangiogenese. Sowohl im Tumorkontext als auch bei Entzündungsreaktionen ist IL-6 in der Lage, die Neubildung von Lymphgefäßen zu induzieren (Yao et al., 2006; Botto et al., 2011; Fiorentini et al., 2011; Shinriki et al., 2011). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sHA in der Lage ist, die Expression von IL-6 in

humanen Chondrozyten zu induzieren (Campo et al., 2010). Interessanterweise induziert sHA in niedrigen Konzentrationen die Expression von IL-6 auch in humanen LECs (Schmaus, Doktorarbeit, 2011). Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob der pro-proliferative Effekt niedriger sHA-Konzentrationen über den pro-lymphangiogenen Faktor IL-6 vermittelt wird.

Zu diesem Zweck wurden ^3H -Thymidin-Inkorporationsexperimente durchgeführt, in denen LECs mit neutralisierenden anti-IL-6-Antikörpern und sHA behandelt wurden.

IL-6 stimulierte dabei die Proliferation humaner LECs signifikant und konzentrationsabhängig (Abbildung 11A). Die Behandlung der LECs mit blockierenden anti-IL-6-Antikörpern führte zu einem deutlichen Rückgang der IL-6-induzierten Proliferation der Zellen (Abbildung 11A). Der konzentrationsabhängige pro-proliferative Effekt von sHA wird durch eine Präinkubation der LECs mit blockierenden IL-6-Antikörpern nicht beeinflusst (Abbildung 11B). Der pro-proliferative Effekt niedriger sHA-Konzentrationen ist demnach trotz induzierter IL-6-Expression unabhängig von diesem Zytokin.

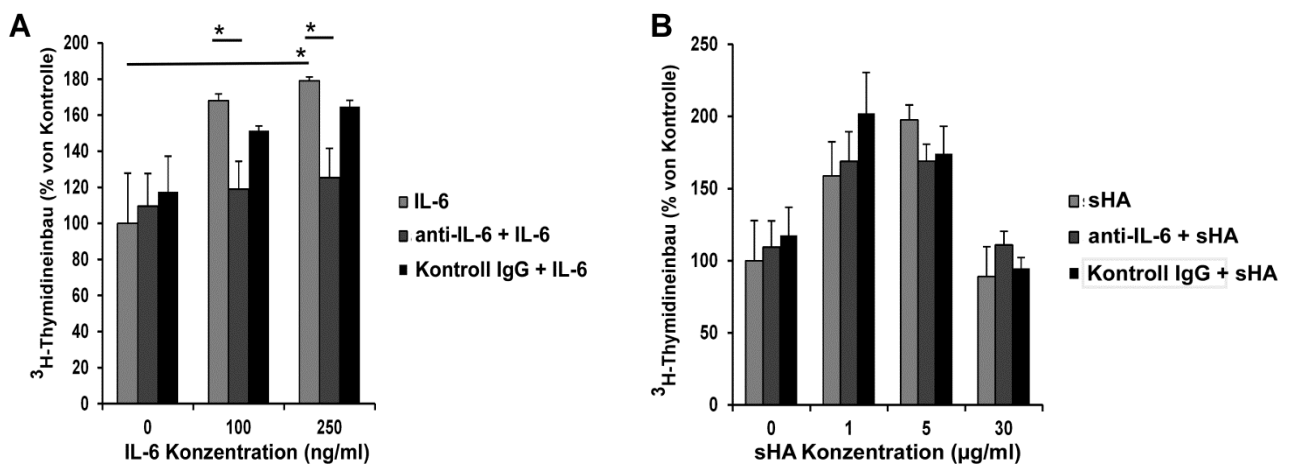


Abbildung 11: IL-6 besitzt keinen Einfluss auf die pro-proliferative Wirkung von sHA.

(A) Primäre humane LECs wurden in ^3H -Thymidininkorporationsassays mit blockierendem anti-IL-6-Antikörper oder einer entsprechenden Isotypkontrolle inkubiert. Anschließend wurden die LECs für 96 h mit 100 bzw. 250 ng/ml IL-6 inkubiert. (B) LECs wurden für 1 h mit blockierendem anti-IL-6-Antikörper oder einer entsprechenden Isotypkontrolle inkubiert. Anschließend wurden die LECs für weitere 96 h mit 1, 5 bzw. 30 µg/ml sHA behandelt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. * = $p < 0,05$.

3.3.2 Identifizierung der von sHA in LECs regulierten Zellsignalwege

Zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von sHA auf das Verhalten von LECs sollte untersucht werden, welche Zellsignalwege durch sHA in LECs reguliert werden. Im Rahmen der sHA-vermittelten Aktivierung von Immunzellen, der Angiogenese oder im Tumorkontext konnten bereits mehrere Zellsignalwege identifiziert werden, die durch sHA aktiviert werden. sHA vermittelt die Reifung und Zytokinexpression von dendritischen Zellen und Makrophagen über die Aktivierung des ERK-Signalweges unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Termeer et al., 2000, 2002; Horton et al., 2002). Eine Behandlung von Endothelzellen mit sHA führt zudem zu einer Aktivierung des ERK-Signalweges unter Beteiligung der Proteinkinase C. Eine Blockade der sHA-induzierten und CD44-abhängigen ERK-Aktivierung inhibiert hingegen die Proliferation der Endothelzellen (Slevin et al., 1998).

Zur Identifizierung der in LECs durch sHA induzierten Signalwege wurden die Zellen mit sHA inkubiert und in Zeitreihen mögliche Anstiege oder Abnahmen am Anteil phosphorylierter Signalmoleküle untersucht.

Die Behandlung von LECs mit einer pro-proliferativen sHA-Konzentration von 5 μ g/ml führte zu keiner sichtbaren Regulation der Expression der untersuchten Signalmoleküle (Abbildung 12A). Gelegentliche leichte Regulationen konnten nicht bestätigt werden. Die Inkubationszeiten wurden bis auf mehrere Stunden ausgeweitet, doch konnten auch dort keine zuverlässigen und reproduzierbaren Veränderungen in der Anzahl der phosphorylierten Signalmoleküle beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

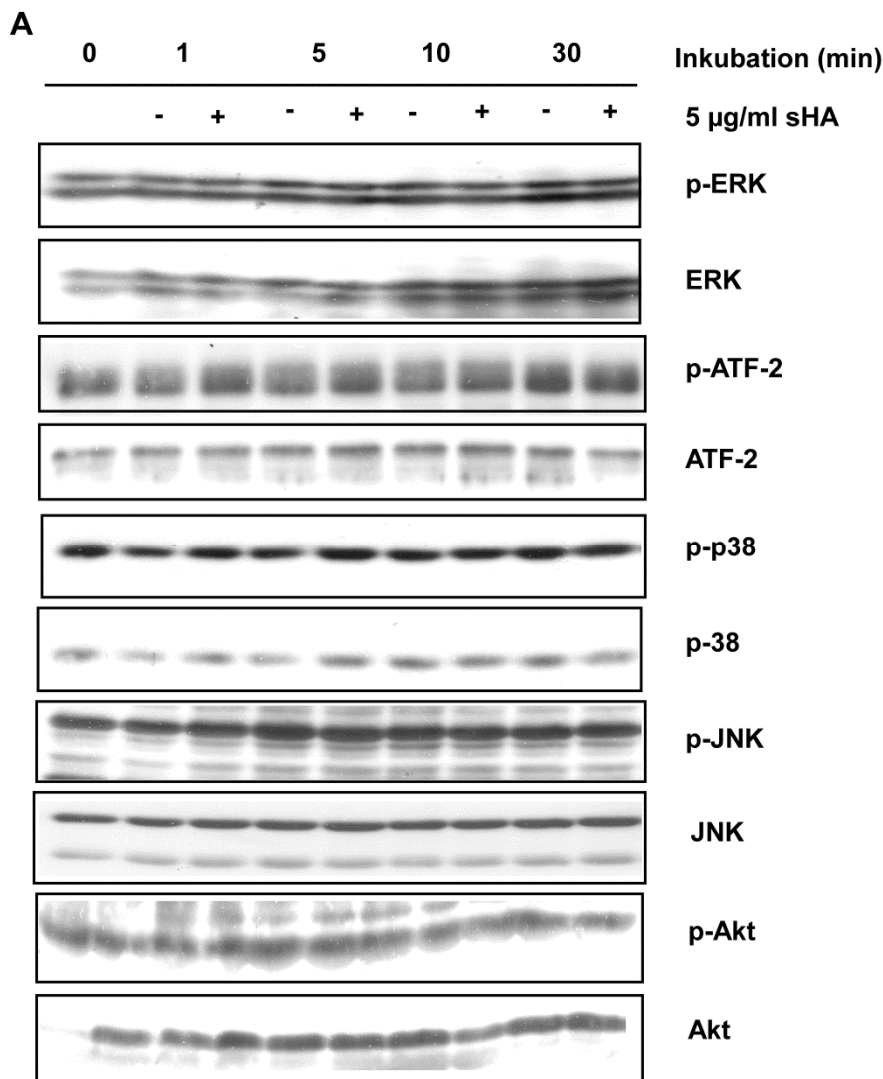


Abbildung 12A: Untersuchung der Regulierung von Signalmolekülen in LECs nach einer Behandlung mit sHA.

Primäre humane LECs wurden für 0, 1, 5, 10 und 30 min mit 5 µg/ml sHA inkubiert oder blieben unbehandelt. Nach der Stimulierung wurden die Zellen lysiert und das Lysat mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Primärantikörper wurden in optimierten Konzentrationen über Nacht bei 4 °C in 1% BSA-Lösung inkubiert. Die Inkubation mit dem 1:1000 verdünnten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte für 30 min bei RT. Als Kontrolle dienten unbehandelte LECs.

Der NF-κB-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei sHA-induzierten Effekte in einer Reihe von verschiedenen Prozessen (Fitzgerald et al., 2000; Horton et al., 2002; Termeer et al., 2002). Die mögliche Aktivierung des NF-κB-Signalweges durch sHA, in deren Folge eine Translokation von NF-κB vom Zytoplasma in den Kern stattfindet, wurde durch Immunfluoreszenztechniken untersucht.

Während die Behandlung von LECs mit LPS die Translokation von NF-κB vom Zytoplasma in den Nukleus induziert (Abbildung 12B), konnte weder bei niedrigen sHA-Konzentrationen

von 1 und 5 $\mu\text{g/ml}$ noch bei 30 $\mu\text{g/ml}$ eine entsprechende Translokation beobachtet werden (Abbildung 12B).

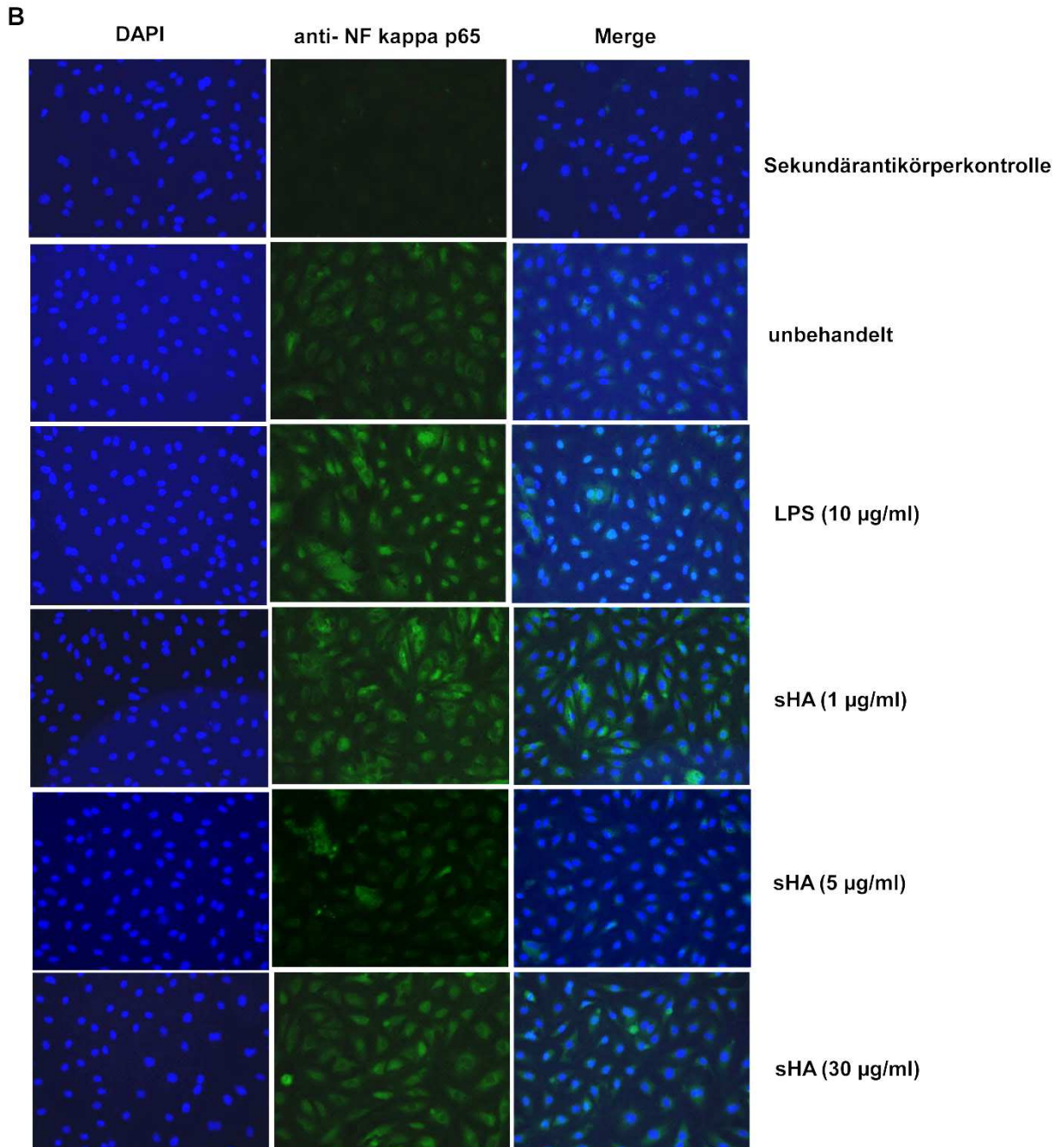


Abbildung 12B: sHA induziert keine Translokation von NF- κ B in den Nukleus von LECs.

Primäre humane LECs wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS oder 0, 1, 5 und 30 $\mu\text{g/ml}$ sHA behandelt. Anschließend wurden die LECs gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt, die Detektion von NF- κ B p65 erfolgte durch spezifische Antikörper. In der linken Spalte sind die Kernfärbungen, in der Mitte die Färbung von NF- κ B p65 und rechts die Merge-Aufnahmen zu erkennen.

3.4 Untersuchung der Wirkungsmechanismen hoher sHA-Konzentrationen

Hohe sHA-Konzentrationen ab 20 $\mu\text{g/ml}$ wirken inhibitorisch auf die Proliferation und Migration von LECs, hemmen die Ausbildung gefäßartiger Strukturen und beeinflussen den Zellzyklus durch Induktion eines G1-Arrests. Im Folgenden sollte untersucht werden, welche molekularen Mechanismen diese inhibitorischen Effekte vermitteln und welchen zusätzlichen Einfluss hohe sHA-Konzentrationen auf LECs haben.

3.4.1 Der anti-proliferative Effekt von sHA wird durch TGF- β vermittelt

Hohe sHA-Konzentrationen führen zu einer Hochregulierung von TGF- β -1, -2 und -3 in LECs auf RNA- und Proteinebene (Schmaus, Doktorarbeit, 2011). TGF- β spielt eine wichtige Rolle im Kontext von Tumoren, Wundheilung und Lymphödem und besitzt anti-lymphangiogene Wirkung (Clavin et al, 2008; Oka et al., 2008; Avraham et al., 2010a; Liao et al., 2011; Suzuki et al., 2012). Aufgrund seiner anti-lymphangiogenen Wirkungsweise und seiner möglichen Rolle in der Vermittlung des inhibitorischen Effekts hoher sHA-Konzentrationen auf das Verhalten von LECs sollte die Wirkung der TGF- β -Isoformen 1, 2 und 3 auf die Proliferation humaner LECs untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden LECs entweder mit den drei Isoformen behandelt oder TGF- β durch entsprechende Antikörper neutralisiert und die Auswirkung dieser Inhibierung auf die Proliferation der LECs analysiert.

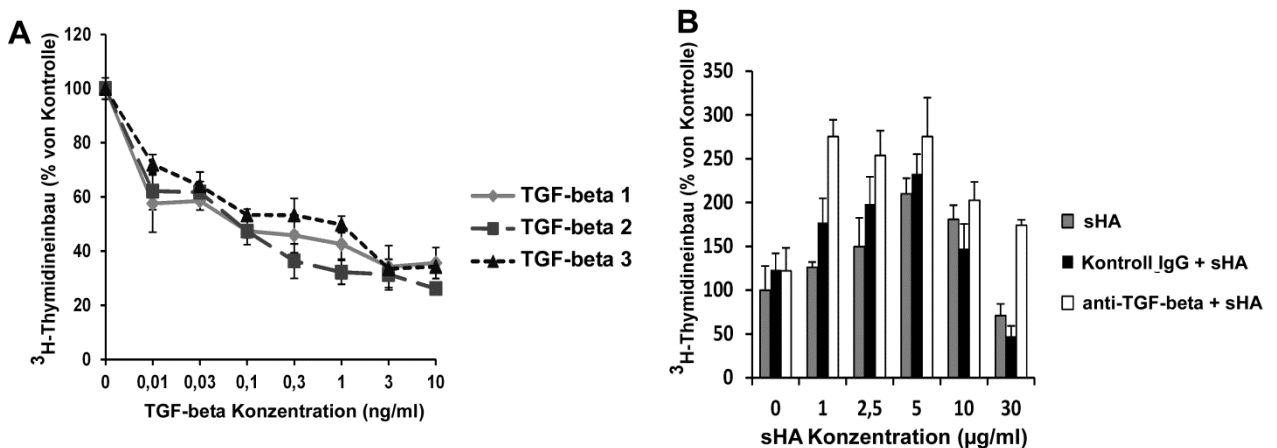


Abbildung 13: TGF- β inhibiert die Proliferation von LECs *in vitro* und vermittelt den anti-proliferativen Effekt hoher sHA-Konzentrationen.

(A) Primäre humane LECs wurden für 96 h mit 0, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 und 10 ng/ml TGF- β -1, -2 und -3 inkubiert. (B) LECs wurden für 1 h mit 20 $\mu\text{g/ml}$ pan-anti-TGF- β -Antikörper inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit 0, 1, 2,5, 5, 10 und 30 $\mu\text{g/ml}$ sHA für 96 h. Der Einfluss auf die Proliferation wurde durch ^3H -Thymininkorporation getestet. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Alle drei TGF- β -Isoformen wirken konzentrationsabhängig anti-proliferativ (Abbildung 13A). Im Kontext von sHA führte die Neutralisierung von TGF- β durch einen pan-anti-TGF- β -Antikörper bei gleichzeitiger Behandlung mit sHA zu einer deutlichen Reduktion des inhibitorischen Effekts hoher sHA-Konzentrationen (Abbildung 13B). Dies legt nahe, dass die hemmende Wirkung von sHA durch die durch hohe sHA-Konzentrationen induzierte TGF- β -Expression vermittelt wird.

3.4.2 TGF- β induziert eine Herunterregulierung lymphatischer Marker in LECs

TGF- β -1 ist in der Lage in primären Endothelzellen eine Endotheliale-Mesenchymale-Transition (EndoMT) zu induzieren. Diese geht mit einer morphologischen Veränderung der Zellen, einer Herunterregulierung endothelialer oder lymphatischer Marker und einer Hochregulierung mesenchymaler Marker einher (Zeisenberg et al., 2007; Clavin et al., 2008).

Aufgrund der Fähigkeit hoher sHA-Konzentrationen, die Expression von TGF- β -1, -2 und -3 in LECs zu induzieren (Schmaus, Doktorarbeit 2011), sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die drei TGF- β -Isoformen 1, 2 und 3 in der Lage sind, eine EndoMT in LECs zu induzieren. Diese könnte sich in der Herunterregulierung der lymphatischen Marker Prox-1, LYVE-1 und VEGFR-3 und der Hochregulierung des lymphatischen Markers Vimentin widerspiegeln. Zusätzlich wurde untersucht, ob TGF- β -1, -2 und -3 in der Lage sind, die für eine EndoMT-typische morphologische Veränderung der LECs zu induzieren.

Hierfür wurden die LECs in einer Zeitreihe von mehreren Tagen mit verschiedenen Konzentrationen von TGF- β -1, -2 und -3 behandelt. Die Expression der lymphatischen und mesenchymalen Marker wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Zusätzlich wurde die Morphologie der LECs im Laufe der Behandlung dokumentiert.

Nach 72 h Behandlung ist verglichen mit den unbehandelten LECs eine deutliche Herunterregulierung von Prox-1 und LYVE-1 durch die drei TGF- β -Isoformen zu erkennen, wobei TGF- β -2 dabei über die stärkste Wirkung verfügte (Abbildung 14A). Bei einer Behandlung von höheren TGF- β -3 Konzentrationen ist allerdings eine deutliche Induktion der LYVE-1-Expression zu erkennen (Abbildung 14A). Die Expression des lymphatischen Markers VEGFR-3 war zu diesem Zeitpunkt unverändert (Abbildung 14A). Neben der Herunterregulierung von Prox-1 und LYVE-1 konnte keine Regulierung der Vimentin-Expression festgestellt werden (Abbildung 14A).

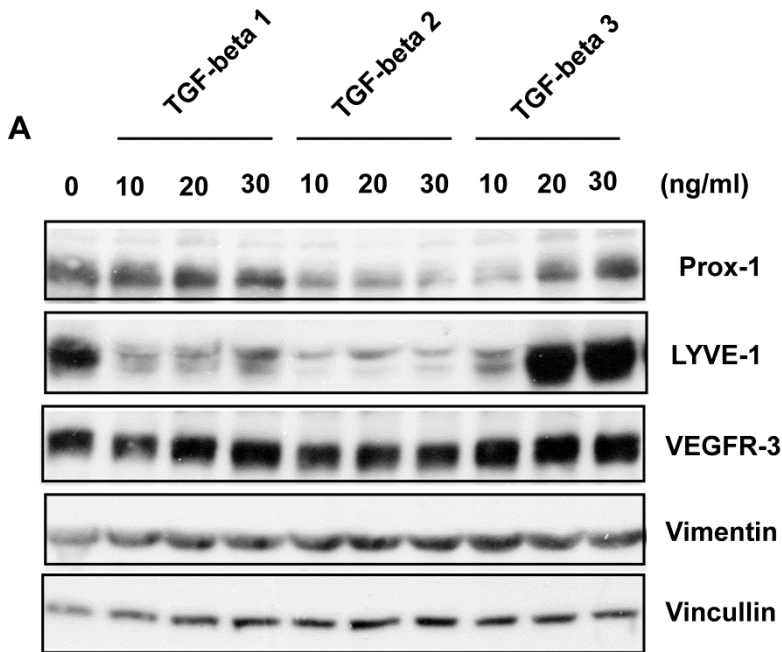


Abbildung 14A: TGF- β -1, -2 und -3 besitzen einen Einfluss auf die Expression von Prox-1 und LYVE-1 in primären humanen LECs.

Primäre humane LECs wurden für 72 h mit 0, 10, 20 und 30 ng/ml TGF-1, -2 und -3 behandelt. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Expression von Prox-1, LYVE-1, VEGFR-3 und Vimentin wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Vincullin diente als Ladekontrolle.

Um zu untersuchen, ob eine längere Inkubation der LECs mit den drei TGF- β -Isoformen einen Effekt auf die Expression von VEGFR-3 und Vimentin besitzen, wurden die Zellen für 100 h mit TGF- β -1, -2 und -3 behandelt.

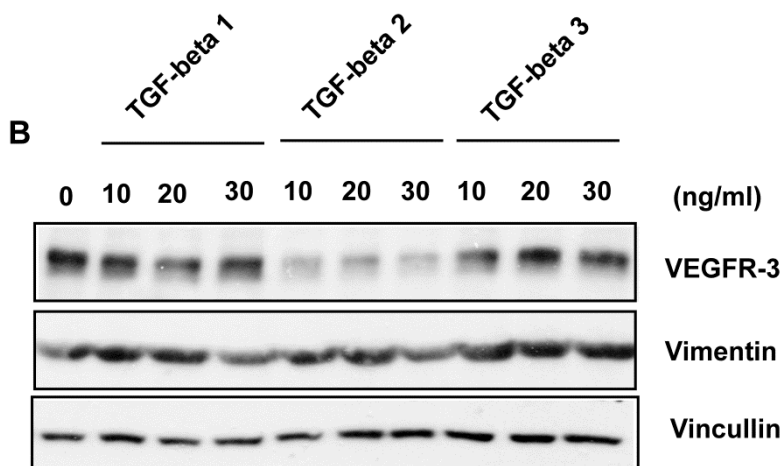


Abbildung 14B: Die Behandlung von LECs mit TGF- β -2 führt zu einer Herunterregulierung von VEGFR-3.

Primäre humane LECs wurden für 100 h mit 0, 10, 20 und 30 ng/ml TGF- β -1, -2 und -3 behandelt. Die Expression von VEGFR-3 und Vimentin wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Vincullin diente als Ladekontrolle.

Im Gegensatz zu einer Behandlung von 72 h kann nach 100 h eine Herunterregulierung von VEGFR-3 registriert werden, die am stärksten bei einer Inkubation mit TGF- β -2 ausfällt (Abbildung 14B). Die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin war auch zu diesem späteren Zeitpunkt unverändert (Abbildung 14B).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zusätzlich untersucht werden, ob TGF- β -1, -2 und -3 eine im Zusammenhang mit einer EndoMT häufig anzutreffende morphologische Veränderung der LECs von einem endothelialen zu einem fibroblastenähnlichen Phänotyp induzieren können. Hierfür wurden die LECs für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der drei TGF- β -Isoformen behandelt und die Morphologie der LECs dokumentiert.

Die Behandlung der LECs mit verschiedenen Konzentrationen von TGF- β -1, -2 und -3 führte nur zu einer geringen Veränderung der Zellmorphologie, wobei bei TGF- β -2 noch der stärkste Effekt zu beobachten war (Abbildung 14C). Bei früheren und späteren Zeitpunkten wurden ebenfalls keine deutlichen morphologischen Veränderungen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

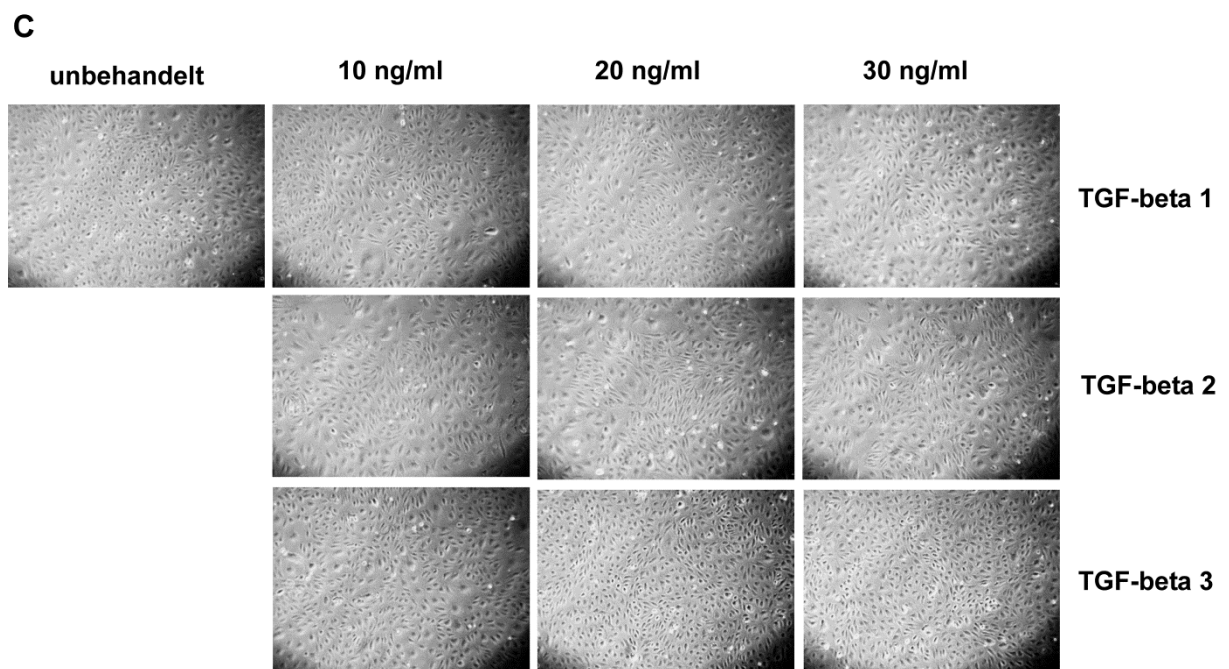


Abbildung 14C: TGF- β -1, -2 und -3 besitzen einen nur schwachen Effekt auf die Morphologie von LECs

Primäre humane LECs wurden für 72 h mit 0, 10, 20 und 30 ng/ml TGF- β -1, -2 und -3 inkubiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle drei TGF- β -Isoformen, die durch hohe SHA-Konzentrationen in LECs induziert werden (Schmaus, Doktorarbeit 2011), in der Lage sind, die Expression der lymphatischen Marker negativ zu regulieren (Abbildung 14A und

14B). Die Wirkung von TGF- β -1, -2 und -3 auf die Morphologie der LECs fiel hingegen schwach aus (Abbildung 14C).

3.4.3 Hohe sHA-Konzentrationen führen zu einem Verlust der Expression lymphatischer Marker

Eine Behandlung von LECs mit sHA führt zu einer konzentrationsabhängigen Hochregulierung von TGF- β -1, -2 und -3 auf der RNA- und Proteinebene (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Eine erhöhte TGF- β -Expression bewirkt eine verringerte Proliferation und Migration von LECs (Clavin et al., 2008; Oka et al., 2008). Zudem wird durch TGF- β eine EndoMT induziert, die mit der Herunterregulierung lymphatischer Marker und morphologischen Veränderungen der LECs einhergeht (Oka et al., 2008; Clavin et al., 2008). Im Folgenden wurde die Wirkung hoher sHA-Konzentrationen, auf die Morphologie und die Markerexpression von LECs näher untersucht.

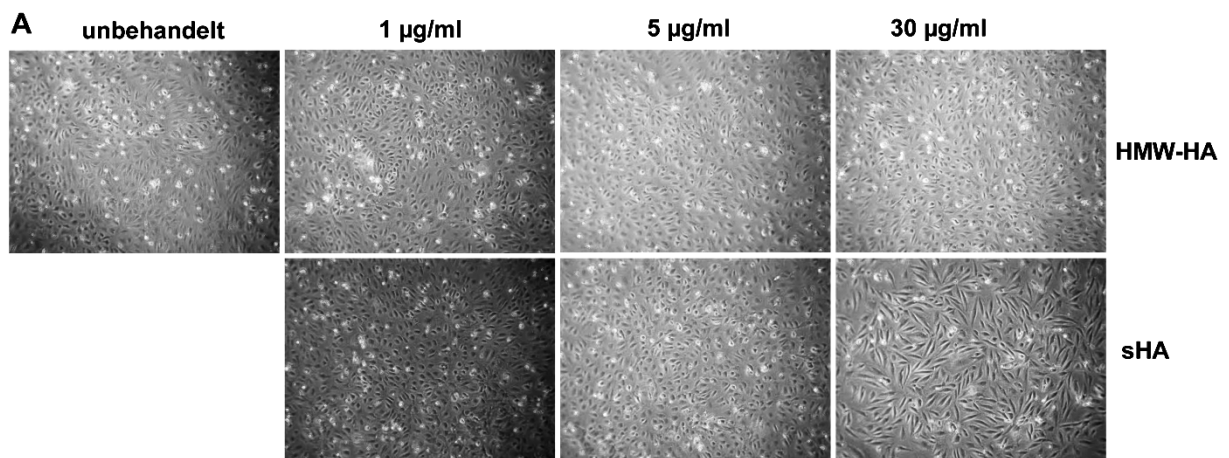


Abbildung 15A: Hohe sHA-Konzentrationen induzieren einen morphologischen Wandel von LECs.

LECs wurden für 96 h mit 0, 1, 5 und 30 µg/ml HMW-HA oder sHA behandelt und ihre Morphologie analysiert.

Im Gegensatz zur HMW-HA und niedrigen sHA-Konzentrationen führte die Behandlung mit hohen sHA-Konzentrationen zu einer deutlichen Veränderung der Morphologie der LECs von einem endothelialen zu einem fibroblastenähnlichen Phänotyp (Abbildung 15A). Diese Veränderung wurde nach 48 Stunden sichtbar (Daten nicht gezeigt). Dies könnte ein Indiz für eine durch sHA-induzierte EndoMT sein und für einen Verlust der lymphatischen Identität der Zellen sprechen.

Der entscheidende Regulator für die lymphatische Identität ist Prox-1 (Wigle und Oliver, 1999; Wigle et al., 2002; Lee et al., 2009). Um zu testen, ob die sHA-induzierten morphologischen Veränderungen auch mit einer veränderten Expression von Prox-1 einhergehen, wurden LECs erneut mit unterschiedlichen Konzentrationen an sHA behandelt und mittels Immunfluoreszenz analysiert.

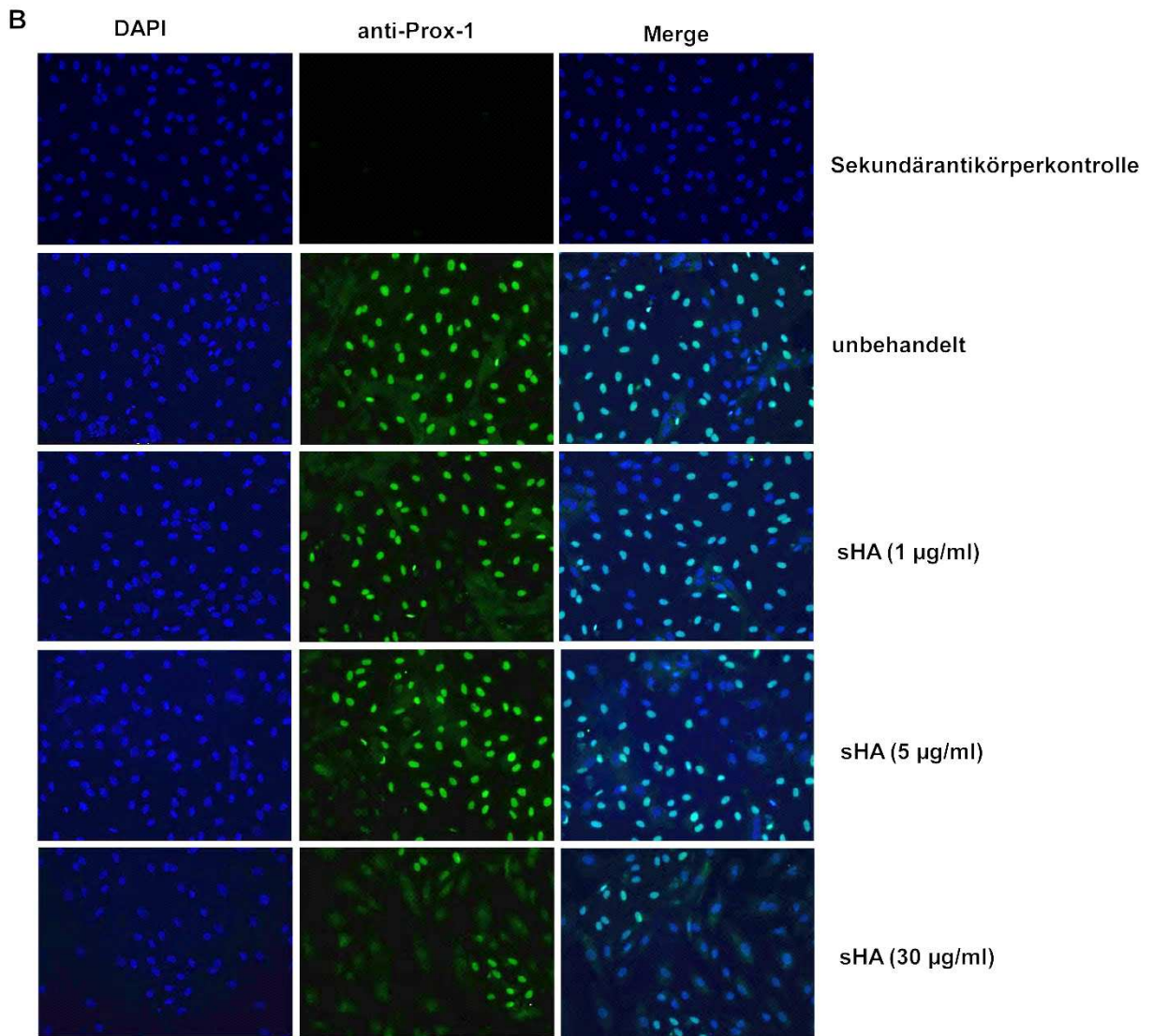


Abbildung 15B: sHA induziert in hohen Konzentrationen eine Herunterregulierung des lymphatischen Markers Prox-1. LECs wurden für 96 h mit 0, 1, 5 und 30 µg/ml sHA inkubiert. Danach wurden die LECs fixiert, permeabilisiert und mit 1 µg/ml anti-Prox-1 Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne der LECs mit DAPI angefärbt und die Expression von Prox-1 mittels Lasermikroskopie untersucht.

Die Behandlung von LECs mit hohen sHA-Konzentrationen führte in der Tat zu einer starken Abnahme an Prox-1-positiven Zellen und einer deutlichen Änderung der Morphologie der LECs, während bei unbehandelten Zellen und niedrigen sHA-Konzentrationen keine Veränderungen beobachtet werden konnten (Abbildung 15B).

Um den Einfluss von sHA auf die Expression weiterer lymphendothelialer Marker zu testen, wurden LECs mit steigenden sHA-Konzentrationen behandelt und die Expression von VEGFR-3, Prox-1, LYVE-1 und Vincullin mittels Western Blot untersucht. Zur Untersuchung, ob die durch hohe sHA-Konzentrationen vermittelte Herunterregulierung der lymphatischen Marker über TGF- β vermittelt wird, dessen regulative Wirkung bereits nachgewiesen werden konnte (Abbildung 14A und 14B), wurden die LECs zusätzlich mit blockierenden bzw. neutralisierenden pan-anti-TGF- β -Antikörpern präinkubiert.

Die Expression der lymphatischen Marker VEGFR-3, Prox-1 und LYVE-1 wird durch sHA konzentrationsabhängig reguliert. Bei niedrigen sHA-Konzentrationen konnte eine leichte Hochregulierung von VEGFR-3, Prox-1 und LYVE-1 beobachtet werden, während bei hohen sHA-Konzentrationen nahezu keine Expression dieser Moleküle mehr nachzuweisen war (Abbildung 15C). Die durch sHA-induzierte Abnahme der Expression von VEGFR-3, Prox-1 und LYVE-1 in LECs wird jedoch nicht über TGF- β oder LYVE-1 vermittelt. Eine Neutralisierung oder Inhibierung dieser Moleküle besaß keinen Einfluss auf die Regulation der Markerexpression auf LECs durch sHA (Abbildung 15D)

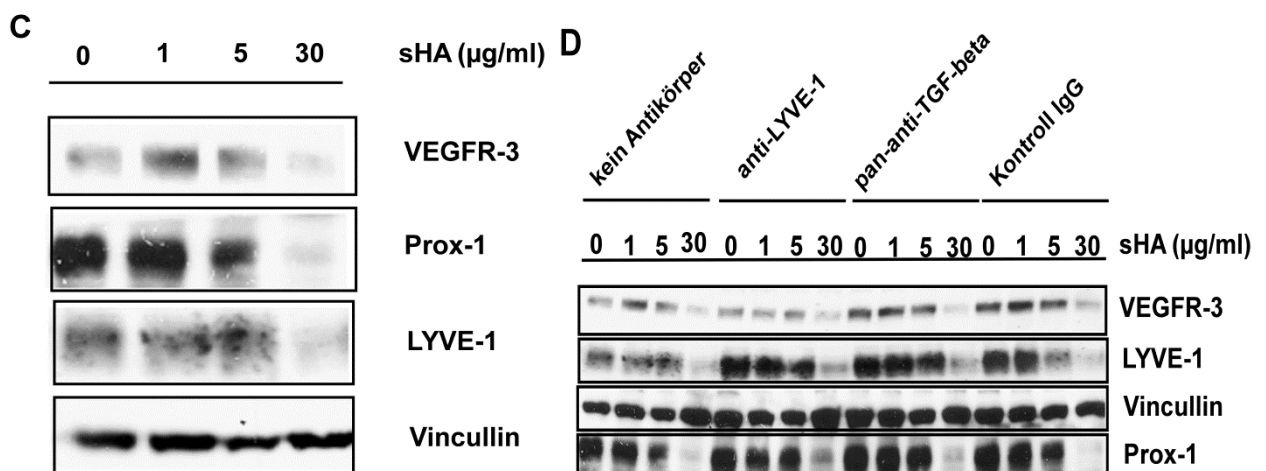


Abbildung 15C und 15D: Hohe sHA-Konzentrationen induzieren LYVE-1- und TGF- β -unabhängig die Herunterregulierung der lymphatischen Marker VEGFR-3, Prox-1 und LYVE-1. (C) LECs wurden für 96 h mit 0, 1, 5 und 30 μ g/ml sHA behandelt. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Expression der lymphatischen Marker VEGFR-3, Prox-1 und LYVE-1 untersucht. Vincullin diente als Ladekontrolle. (D) LECs wurden entweder mit 20 μ g/ml blockierendem anti-LYVE-1-Antikörper, 20 μ g/ml pan-anti-TGF- β -Antikörper, einer entsprechenden Isotypkontrolle inkubiert oder blieben unbehandelt. Danach wurden die LECs für 96 h mit 0, 1, 5 und 30 μ g/ml sHA behandelt. Die Expression von VEGFR-3, LYVE-1 und Prox-1 wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Vincullin diente als Ladekontrolle.

3.5 Untersuchung der Relevanz von LYVE-1 im Tumorkontext

3.5.1 Kreuzung der B6.129S1-Lyve1^{tm1Lhua}/J-Mäuse auf einen genetischen Balb/c-Hintergrund

Die Mutation des LYVE-1-Gens erfolgte durch die Entfernung eines Teils von Exon 2, Intron 2, Exon 3 und Intron 3 (Huang et al., 2006). Durch die Verwendung eines spezifischen Zielvektors kam es zu einer Leserasterverschiebung im murinen LYVE-1-Gen. Der verwendete Zielvektor wurde mittels Elektroporation in embryonale Mausstammzellen transfiziert. Erfolgreich geschaffene Klone wurden anschließend in C57/BL/6J-Blastozysten injiziert. Durch anschließende Verpaarungen über mehrere Generationen entstanden die B6.129S1-Lyve1^{tm1Lhua}/J-Mäuse (Huang et al., 2006).

Die ursprünglichen B6.129S1-Lyve1^{tm1Lhua}/J-Mäuse verfügen bis auf eine leicht erhöhte Strömungsgeschwindigkeit der Lymphflüssigkeit über keine phänotypischen Auffälligkeiten (Huang et al., 2006). Ob diese Anomalität auch bei den Balb/c.129S1-LYVE-1-Mäusen vorliegt, wurde nicht überprüft. Im Allgemeinen verfügen die Balb/c.129S1-LYVE-1-Mäuse im Vergleich zu Balb/c-Wildtypmäusen über keinen auffälligen Phänotyp.

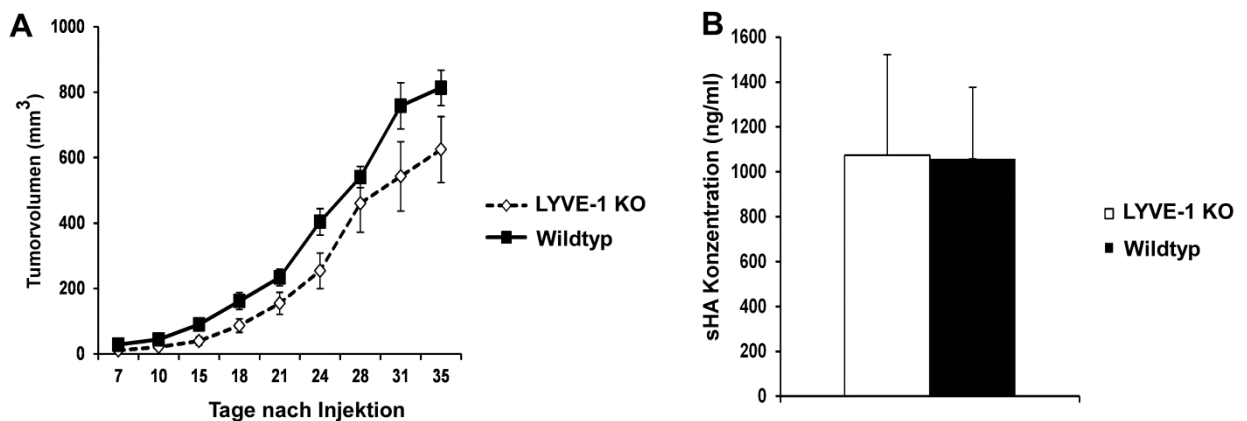
Zur Durchführung der Tumortransplantationsversuche wurden die B6.129S1-Lyve1^{tm1Lhua}/J-Mäuse auf einen genetischen Balb/c-Hintergrund gekreuzt. Homozygote B6.129S1-Lyve1^{tm1Lhua}/J-Mäuse wurden mit Balb/c-Wildtyp-Mäusen verpaart. Die daraus resultierende F1-Generation heterozygoter Tiere wurde erneut mit Balb/c-Wildtyp-Mäusen bis zur F6-Generation verpaart. Schließlich wurden heterozygote Tiere der F6-Generation miteinander verpaart, wobei die homozygoten Tiere für die Tumordinjektionsversuche verwendet wurden. Während der Verpaarungen und Zucht homozygoter Wildtyp- und Balb/c.129S1-LYVE-1-KO-Mäuse wurde der Genotyp mittels einer PCR-gestützten Analyse bestimmt. Für die Tierversuche wurden Mäuse in einem Alter von 8-12 Wochen verwendet.

3.5.2 Injektion von murinen 4T1-Brustkrebszellen in LYVE-1-KO-Mäuse

Lymphangiogenese spielt eine zentrale Rolle bei der Metastasierung. Die Tumor-induzierte Lymphangiogenese und die damit einhergehende Zunahme der Lymphgefäßdichte korreliert mit der Metastasierung in regionale Lymphknoten und Organe und geht mit einer schlechten Prognose für die Patienten einher (Karpanen et al., 2001; Mandriota et al., 2001; Skobe et al., 2001; Hoshida et al., 2006; Su et al., 2006).

sHA kann Lymphangiogenese *ex vivo* und *in vivo* beeinflussen (Schmaus, Quagliata, Bauer et al.; in Vorbereitung). Im Folgenden wurde untersucht, ob LYVE-1 eine Rolle bei der Metastasierung muriner Tumorzellen spielt. Zu diesem Zweck wurden LYVE-1-KO-Mäusen mit murinen 4T1-Brustkrebszellen implantiert. 4T1-Zellen sind hochmetastatisch und befallen bevorzugt Lymphknoten, Lunge und Leber (Aslakson und Miller, 1992). Sie produzieren *in vivo* sHA in einer Konzentration von bis zu 1 µg/ml, also in einer Konzentration, die *in vitro* und *ex vivo* die Lymphangiogenese fördert (Schmaus, Doktorarbeit 2011).

Das Wachstum von 4T1-Tumoren in den Balb/c Wildtyp- und LYVE-1-KO-Mäusen unterschied sich nicht signifikant (Abbildung 16A). Zusätzlich konnte bestätigt werden, dass auch in diesem Experiment sowohl die Tumore der Wildtyp- als auch die der LYVE-1-KO-Mäuse sHA in pro-proliferativen Konzentrationen von 1 µg/ml produzieren (Abbildung 16B). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen konnte bezüglich der Lymphknotenvolumen registriert werden. Bei LYVE-1-KO-Mäusen waren die ipsilateralen axillaren Lymphknoten verglichen mit den Wildtyp-Mäusen signifikant verkleinert (Abbildung 16C). Dies könnte ein Hinweis auf eine Rolle von LYVE-1 in der lokalen Lymphknotenmetastasierung sein. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und LYVE-1-KO-Mäusen bezüglich der Anzahl sichtbarer Lungenmetastasen nachgewiesen werden (Abbildung 16D).



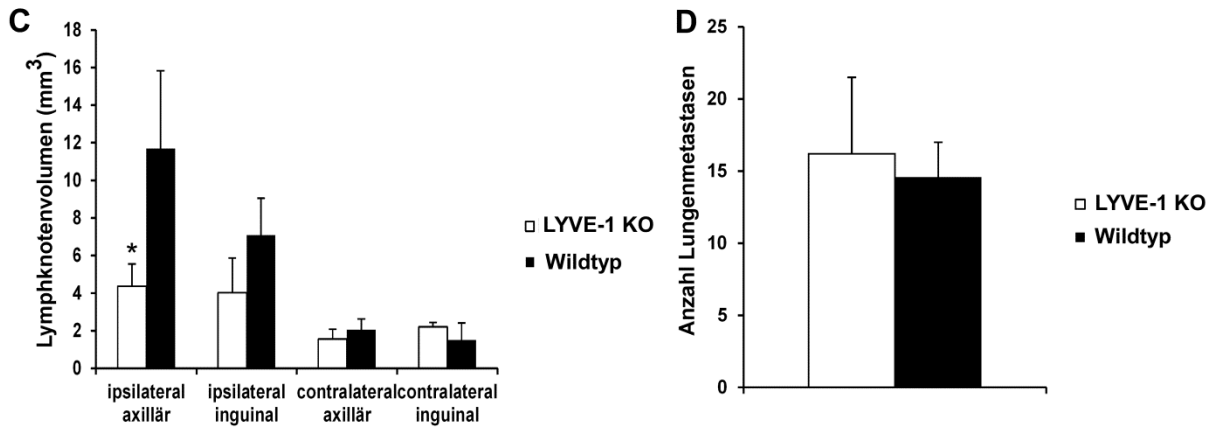


Abbildung 16: LYVE-1 besitzt eine Rolle in der lokalen Lymphknotenmetastasierung. (A) 4T1-Zellen wurden subkutan in Balb/c-Wildtyp (n = 7) und LYVE-1-KO (n = 5)-Mäuse injiziert und das Wachstum der Tumoren verfolgt. (B) Aus den Tumoren von Balb/c-Wildtyp (n = 5) und LYVE-1-KO (n = 5)-Mäusen wurde die interstitielle Flüssigkeit extrahiert und die sHA-Konzentration in der TIF mittels HA-ELISA bestimmt. (C) Die inguinalen und axillaren Lymphknoten wurden aus den Balb/c-Wildtyp (n = 5) und LYVE-1-KO (n = 3)-Mäusen entfernt und ihr Volumen bestimmt. (D) Die Anzahl der makroskopisch sichtbaren Lungenmetastasen von Balb/c-Wildtyp (n = 7) und LYVE-1-KO (n = 5)-Mäusen wurde bestimmt. * = p < 0,05. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten niedermolekulare Fragmente des Glykosaminoglykans Hyaluronsäure (sHA) als neue Klasse bislang unbekannter lymphangiogener Faktoren charakterisiert werden. Die lymphangiogene Wirkung von sHA ist konzentrations- und größenabhängig. Der pro-proliferative Effekt von sHA wird über LYVE-1, der anti-proliferative Effekt hoher sHA-Konzentrationen über die Expression von TGF- β vermittelt. Neben der hemmenden Wirkung hoher sHA-Konzentrationen konnte zusätzlich eine Abnahme der Expression lymphatischer Marker und eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden. Im Tumorkontext konnte erstmals gezeigt werden, dass LYVE-1 eine Rolle bei der Metastasierung in die lokalen Lymphknoten spielt.

4.1 Bestätigung der pro-proliferativen Eigenschaften von sHA *in vitro* durch eine sHA-vermittelte Lymphangiogenese *ex vivo* und *in vivo*

Niedrige sHA-Konzentrationen vermittelten *in vitro* einen signifikanten pro-proliferativen Effekt auf LECs (Abbildung 2A-C). Die pro-lymphangiogene Wirkung dieser sHA-Konzentrationen konnte zusätzlich *ex vivo* im LRA nachgewiesen werden. Eine Behandlung von 5 $\mu\text{g/ml}$ sHA induzierte unter Verwendung des *Ductus Thoracicus* ein signifikantes Auswachsen der Lymphgefäße (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Die intradermale Injektion von sHA in Mäuse stimulierte die Lymphangiogenese in der Haut (Quagliata, Doktorarbeit 2011). Zusätzlich konnte eine Induktion der Lymphangiogenese in regionalen Lymphknoten beobachtet werden, ein Indiz dafür, dass sHA nicht nur lokal, sondern auch regional pro-lymphangiogen wirkt (Quagliata, Doktorarbeit 2011).

Niedrige sHA-Konzentrationen von 1-5 $\mu\text{g/ml}$, die *in vitro* die Migration und Gefäßbildung von LECs hemmen (Abbildung 3 und 4A und 4B), entfalten ihre inhibitorische Wirkung *ex vivo* und *in vivo* somit nicht. Eine Erklärung für die scheinbare Diskrepanz zwischen den *in vitro* und *ex vivo* bzw. *in vivo* Daten könnte in der unterschiedlichen Komplexität und Dauer der Experimente zu finden sein. Die Wirkung von sHA könnte durch andere Zelltypen wie Perizyten oder Immunzellen beeinflusst oder zeitlich eng reguliert werden. Eine potentielle, früh stattfindende inhibitorische Wirkung von sHA auf die Migration und Gefäßbildung kann dennoch prinzipiell *ex vivo* und *in vivo* nicht ausgeschlossen werden. Solch eine Inhibierung könnte den LECs einen zeitlichen Spielraum für eine gesteigerte Proliferation geben und das z.B. in der Wundheilung beobachtete verspätete Einsetzen der Lymphangiogenese im

Vergleich zur Angiogenese teilweise erklären (Paavonen et al., 2000; Nakao et al., 2011; Baluk et al., 2005). Eine dauerhafte Inhibierung der Migration und Gefäßbildung von LECs durch niedrige sHA-Konzentrationen kann durch die pro-lymphangiogene Wirkung dieser Konzentrationen *ex vivo* und *in vivo* allerdings nahezu ausgeschlossen werden.

4.2 Vergleich der Effekte von sHA auf die Proliferation, Migration und Gefäßbildung von LECs und BECs

Die angiogene Wirkung von sHA auf Blutendothelzellen ist bereits seit einiger Zeit bekannt (West und Kumar, 1989; Rahmanian et al., 1997; Matou-Nasri et al., 2009; Gao et al., 2010).

Vergleicht man die im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Daten in Bezug auf LECs mit der Wirkung von sHA auf die Proliferation von Blutendothelzellen (BECs), gibt es einige Parallelen. Wie bei LECs bewirken kleine sHA-Moleküle auch bei BECs eine stärkere Proliferation als große HA-Fragmente (West et al., 1985; West und Kumar, 1989; Gao et al., 2008; Cui et al., 2009). Zusätzlich konnte bei BECs ebenfalls eine konzentrationsabhängige biphasische Wirkung der sHA-Moleküle nachgewiesen werden (West et al., 1985; West und Kumar, 1989). Deutliche Unterschiede wurden jedoch hinsichtlich der Dosisempfindlichkeit der Endothelzellen auf sHA festgestellt. Die Breite der pro-proliferativen sHA-Konzentrationen reichte bei BECs von 1-150 µg/ml und ist damit deutlich größer als die in dieser Arbeit bei LECs beobachteten 1-5 µg/ml. Eine Inhibierung der Proliferation von LECs wurde bereits bei Konzentrationen ab 20 µg/ml beobachtet (Abbildung 2A), während eine anti-proliferative Wirkung von sHA auf die BECs erst ab deutlich höheren Konzentrationen verzeichnet werden konnte.

Die physiologische Bedeutung dieser erhöhten Sensitivität der LECs gegenüber sHA könnte in der Regulierung des unterschiedlichen zeitlichen Verlaufs der Lymphangiogenese und Angiogenese bei der Wundheilung zu finden sein. In diesem Prozess kann eine leichte zeitliche Verzögerung der Lymphangiogenese im Vergleich zur Angiogenese beobachtet werden (Paavonen et al., 2000). Es ist durchaus vorstellbar, dass bei hohen sHA-Konzentrationen, wie sie höchstwahrscheinlich temporär und lokal bei Entzündungen oder Wundheilungsprozessen auftreten, die Lymphangiogenese zunächst gehemmt, die Angiogenese jedoch gefördert wird. Mit der Abnahme der Entzündungsreaktion könnte es zu einem Abfall der sHA-Konzentration führen, die für eine Induktion der Proliferation von BECs nicht mehr ausreicht, die Proliferation der LECs jedoch stimulieren könnte.

Im Gegensatz zu ihren pro-proliferativen Wirkungen konnte bei niedrigen Konzentrationen ab 5 µg/ml eine Inhibierung der Migration und Gefäßbildung beobachtet werden (Abbildung 3 und 4A und 4B). In BECs hingegen fördert sHA unter vergleichbaren Bedingungen sowohl die Migration als auch die Gefäßbildung *in vitro* (Rahmanian et al., 1997; Gao et al., 2008; Matou-Nasri et al., 2009). Eine Inhibierung dieser Prozesse konnte auch bei Verwendung höherer sHA-Konzentrationen nicht beobachtet werden (Rahmanian et al., 1997; Gao et al., 2008). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass sHA die Migration und Gefäßbildung von LECs und BECs *in vitro* unterschiedlich beeinflusst. Zusätzlich könnten diese Beobachtungen einen weiteren Beleg für eine erhöhte Sensitivität der LECs gegenüber sHA verglichen mit BECs darstellen.

4.3 LYVE-1 als Rezeptor für sHA

Die Bindung von sHA an CD44 und TLR-4 konnte bereits auf einer Reihe unterschiedlicher Zelltypen nachgewiesen werden (Teder et al., 2002; Termeer et al., 2002; Jiang et al., 2005; Matou-Nasri et al., 2009). Durch die in dieser Arbeit präsentierten Daten wird allerdings ersichtlich, dass weder CD44 noch TLR-4 eine Rolle in der sHA-vermittelten Lymphangiogenese spielen. Die Blockierung von CD44 und TLR-4 auf LECs hatte weder einen Effekt auf die pro-proliferative Wirkung niedriger sHA-Konzentrationen, noch auf die anti-proliferative Wirkung hoher sHA-Konzentrationen (Abbildung 8C-E). Zusätzlich konnte *ex vivo* unter Verwendung des *Ductus thoracicus* aus CD44- und TLR-4-KO-Mäusen gezeigt werden, dass die pro-lymphangiogene Wirkung von sHA unabhängig von CD44 oder TLR-4 ist (Schmaus, Doktorarbeit 2011).

Vielmehr konnte gezeigt werden, dass LYVE-1 eine zentrale Rolle in der sHA-vermittelten Lymphangiogenese spielt. Während sHA in der Lage war, Lymphangiogenese in Gefäßen von Wildtypmäusen zu induzieren, konnte bei Gefäßen aus LYVE-1-KO-Mäusen keine pro-lymphangiogene Wirkung von sHA beobachtet werden (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Die pro-lymphangiogene Wirkung von sHA wird über LYVE-1 vermittelt (Abbildung 8A und 8B). Die Blockierung von LYVE-1 auf der Oberfläche von LECs hob den pro-proliferativen Effekt niedriger sHA-Konzentrationen auf (Abbildung 8A und 8B). Der anti-proliferative Effekt hoher sHA-Konzentrationen blieb von einer LYVE-1-Blockierung allerdings unberührt (Abbildung 8A und 8B). Dies legt den Schluss nahe, dass der inhibitorische Effekt hoher sHA-Konzentrationen durch die Expression von TGF-β über einen weiteren, bis dato nicht

bekanntem Rezeptor oder durch andere Prozesse wie eine Internalisierung von sHA vermittelt wird.

Die Bindung von HMW-HA an LYVE-1 auf der Oberfläche von LECs wird durch Modifikationen der extrazellulären Domäne von LYVE-1 mit negativ-geladenen Sialinsäureresten blockiert (Nightingale et al., 2009). Der pro-lymphangiogene Effekt von sHA wird jedoch über LYVE-1 vermittelt, was den Schluss nahe legt, dass sHA im Gegensatz zur HMW-HA in der Lage ist, mit LYVE-1 zu interagieren. Um ein besseres Verständnis der Interaktion von LYVE-1 mit sHA zu erlangen, wurde der Sialisierungstatus von LYVE-1 auf dermalen LECs untersucht. Durch den Einsatz einer Sialinsäure-spezifischen Neuraminidase und Lektinen wurde eine Sialisierung von LYVE-1 nachgewiesen (Abbildung 9A und 9B). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass alle der erkennbaren LYVE-1-Moleküle in sialisierter Form vorliegen (Abbildung 9C). Bei den hier verwendeten LECs wurde eine Modifizierung von LYVE-1 mit α 2,3-gebundenen Sialinsäureresten nachgewiesen, während auf anderen LECs eine Modifizierung mit α 2,3- und α 2,6-gebundenen Zuckerresten festgestellt wurde (Nightingale et al., 2009). Die Sialisierung von LYVE-1 ist damit offenbar nicht nur zelltypspezifisch reguliert, sondern unterliegt auch Modifikationen innerhalb desselben Zelltyps. Diese Modifikationen könnten vom Ursprung der LECs abhängig sein oder durch Kulturbedingungen der Zellen beeinflusst werden.

Die Sialisierung von LYVE-1 ist in der Lage, die Bindung von HMW-HA an LYVE-1 durch sterische Hinderungen oder Ladungsabstoßungen zu inhibieren (Nightingale et al., 2009). Die Suche nach einem Stimulus, der diese inhibitorischen Glykosilierungen aufhebt, blieb *in vivo* bislang erfolglos (Jackson, 2009). sHA-Moleküle könnten allerdings aufgrund ihrer geringeren Größe und der damit einhergehenden Umgehung der Sialinsäure-vermittelten sterischen Hinderung mit LYVE-1 interagieren und die Proliferation der LECs regulieren. Je geringer die Größe der sHA, desto leichter sollte eine Interaktion mit sHA und LYVE-1 möglich sein. Dies könnte ein Grund dafür sein, weshalb kleine sHA-Moleküle einen stärkeren proliferativen Effekt auf die LECs besaßen als größere HA-Fragmente (Abbildung 2C). In einem Bindungsexperiment konnte gezeigt werden, dass aufgrund des Aufbaus des LYVE-1-Link-Moduls, 4 Ds die kleinste sHA-Größe darstellen, die an ein immobilisiertes LYVE-1-Fusionsprotein binden kann (Banerji et al., 2010). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass 4 Ds die kleinste sHA-Größe darstellte, die in der Lage war, die Proliferation von LECs zu beeinflussen (Abbildung 2A). Kleinere sHA-Moleküle einer Größe

von 3 Ds sind demnach zu klein, um mit LYVE-1 interagieren zu können und verfügen sehr wahrscheinlich deshalb über keine proliferative Wirkung (Abbildung 2A). LYVE-1 könnte somit über seine Sialisierung und die dadurch vermittelte größenabhängige HA-Bindung die Wirkung von HA auf LECs regulieren.

LYVE-1-KO-Mäuse weisen einen normalen Phänotyp auf und es konnten keine Abweichungen in der Lymphgefäßstruktur, dem Migrationsverhalten dendritischer Zellen oder dem Level von HA im Blut der Tiere festgestellt werden (Gale et al., 2007). Auch bei Hypersensitivitätsreaktionen der Haut und der Implantation von Melanomzellen fanden sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und LYVE-1-KO-Mäusen (Gale et al., 2007). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der in dieser Arbeit beschriebenen Relevanz von LYVE-1 bei der sHA-induzierten Lymphangiogenese. In gesundem Gewebe sind nur sehr geringe Mengen an sHA detektierbar, wodurch ein Fehlen des sHA-Rezeptors LYVE-1 nicht zu phänotypischen Auffälligkeiten führen sollte (Schmaus und Klusmeier, unveröffentlichte Daten). Zusätzlich findet Lymphangiogenese in adulten Organismen vor allem bei pathologischen Prozessen statt (Alitalo und Carmeliet, 2002; Alitalo, 2011). Die von Gale et al. in LYVE-1-KO-Mäusen induzierten pathologischen Prozesse wie die Hypersensitivitätsreaktion und das Wachstum von Melanomzellen könnten auch ohne eine signifikante Produktion von sHA ablaufen. So konnte z.B. bei murinen 66cl4- und 67NR-Zellen ein sHA-unabhängiges Tumorwachstum und Metastasierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit können mit dem beobachteten normalen Phänotyp von LYVE-1-KO-Mäusen unter physiologischen und den von Gale et al. induzierten pathologischen Prozessen keine Rückschlüsse auf eine fehlende Relevanz von LYVE-1 in der sHA-vermittelten Lymphangiogenese gezogen werden.

4.4. LYVE-1 fungiert nicht als Corezeptor von PDGFβR auf primären LECs

Hou et al. zeigten, dass LYVE-1 durch eine Komplexbildung mit PDGFβR und β-Catenin an der Regulierung des lymphatischen Flusses beteiligt zu sein scheint, wobei LYVE-1 als Corezeptor von PDGFβR fungiert (Boensch et al., 1999; Hou et al., 2011, 2012). Um zu überprüfen, ob LYVE-1 seine Funktion in der sHA-vermittelten Lymphangiogenese als Corezeptor von PDGFαR oder PDGFβR vermittelt, wurde die Expression dieser Rezeptoren auf den verwendeten dermalen LECs untersucht. Weder auf RNA- noch auf Proteinebene konnte die Expression von PDGFαR oder PDGFβR nachgewiesen werden (Abbildung 10A und 10B). Eine Corezeptorfunktion von LYVE-1 für diese beiden Rezeptoren kann somit

ausgeschlossen werden, was die Bedeutung von LYVE-1 als den Hauptrezeptor für sHA in der sHA-vermittelten Lymphangiogenese unterstreicht.

PDGF-BB ist ein pro-lymphangiogener Faktor, der die Lymphangiogenese *in vitro*, *in vivo* und im Tumorkontext induzieren kann (Cao et al., 2004). Seine lymphangiogene Wirkung vermittelt PDGF-BB dabei über die Bindung an seine Rezeptoren PDGF α R und PDGF β R (Cao et al., 2004; Heldin und Westermark, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sHA und PDGF-BB keine additive Wirkung auf die Proliferation von LECs besaßen, obwohl jeder Stimulus für sich einen Einfluss hatte (Abbildung 6C). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die pro-lymphangiogene Wirkung von sHA über eine Beteiligung von PDGF-BB vermittelt wird. Um dies näher zu untersuchen, könnte PDGF-BB neutralisiert und die Auswirkung dieser Inhibierung auf die sHA-vermittelte Lymphangiogenese untersucht werden. *Ex vivo* induziert PDGF-BB im LRA unter Verwendung des *Ductus thoracicus* aus Wildtyp- und LYVE-1-KO-Mäusen das Auswachsen lymphatischer Gefäße (Schmaus, unveröffentlichte Daten). Somit ist die pro-lymphangiogene Wirkung von PDGF-BB, im Gegensatz zu sHA, unabhängig von LYVE-1. Die beobachtete pro-lymphangiogene Wirkung von PDGF-BB auf LECs ist somit unabhängig von PDGF α R, PDGF β R und LYVE-1. Wie lässt sich dieses Ergebnis interpretieren? Zum einen ist Expression von PDGF α R und PDGF β R im *Ductus thoracicus* bislang nicht genauer analysiert. Diese Rezeptoren könnten dort entweder auf den LECs oder Perizyten exprimiert sein und somit PDGF-BB binden. Des Weiteren könnte die Expression von PDGF α R und PDGF β R von bislang unbekanntem Kulturbedingungen abhängig sein und so variabel reguliert werden. Zusätzlich könnte die pro-lymphangiogene Wirkung von PDGF-BB über einen weiteren, bis dato noch unbekanntem zusätzlichen Rezeptor vermittelt werden. Dieser könnte, beim Fehlen der klassischen PDGF-BB-Rezeptoren PDGF α R und PDGF β R, deren Funktion übernehmen und die pro-lymphangiogenen Eigenschaften von PDGF-BB vermitteln.

4.5 Die molekulare Wirkungsweise niedriger sHA-Konzentrationen

Lymphangiogene Faktoren können die Lymphangiogenese entweder direkt oder indirekt über die Hochregulierung weiterer Faktoren regulieren. Neben VEGF-C verfügen auch PDGF-BB, IGF-1/-2 und das Wachstumshormon GH über einen direkten Wirkmechanismus (Karpanen et al., 2001; Karkkainen et al., 2004; Kataru et al., 2009; Cao et al., 2004; Björndahl et al., 2005; Banziger-Tobler et al., 2008). Die pro-lymphangiogene Wirkung von COX-2, IL-17 und EPO

wird hingegen über die Hochregulierung von VEGF-C vermittelt (Su et al., 2004; Chen et al., 2010; Lee et al., 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass sHA seine lymphangiogene Wirkung unabhängig von VEGF-C und FGF-2 vermittelt. So zeigte sHA einen additiven Effekt mit VEGF-C und FGF-2 auf die Proliferation von LECs (Abbildung 6A und 6B). Dieses Ergebnis konnte im LRA *ex vivo* bestätigt werden. Suboptimale Konzentrationen von VEGF-C und sHA zeigten dort eine additive Wirkung auf das Auswachsen der Lymphgefäße (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Zusätzlich induzierte sHA keine Expression von VEGF-C in LECs *in vitro* (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Während eine Behandlung von BECs mit sHA zu einer Hochregulierung des pro-angiogenen Faktors VEGF-A führte (Cui et al., 2009), konnte eine Inkubation von LECs mit sHA keine Expression pro-lymphangiogener Faktoren wie IGF-1, Ang-1/-2 oder FGF-2 induzieren (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Somit verfügt sHA offenbar über eine direkte pro-lymphangiogene Wirkungsweise, während die Angiogenese zum Teil durch sHA aber auch indirekt durch VEGF-A gefördert werden könnte.

Das Zytokin IL-6 stimuliert die Proliferation von LECs (Abbildung 11a; Fiorentini et al.; 2011). Zusätzlich ist bekannt, dass sHA die Expression von IL-6 in humanen Chondrozyten stimuliert (Campo et al., 2010). Die Behandlung von LECs mit sHA induzierte eine konzentrationsabhängige Hochregulierung von IL-6, mit einem Maximum an IL-6 bei niedrigen sHA-Konzentrationen (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Um eine Rolle von IL-6 in der Vermittlung des pro-proliferativen Effekts niedriger sHA-Konzentrationen zu untersuchen, wurde in Proliferationsassays IL-6 neutralisiert, was allerdings keine Auswirkung auf den pro-proliferativen Effekt niedriger sHA-Konzentrationen hatte (Abbildung 11B). Dies spricht dafür, dass die pro-proliferative Wirkung niedriger sHA-Konzentrationen auf LECs unabhängig von IL-6 reguliert wird. Um jedoch eine endgültige Aussage über die Relevanz von IL-6 in der sHA-vermittelten Lymphangiogenese machen zu können, sollten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Zum einen könnte die Aktivität des von den LECs produzierten und sezernierten IL-6 untersucht werden. Hierbei könnte es sich um eine noch inaktive Form handeln, die eventuell erst im Laufe der Lymphangiogenese aktiviert wird. Zusätzlich sollte die Wirkung von IL-6 in der sHA-vermittelten Lymphangiogenese *ex vivo* untersucht werden. Im LRA könnte eine sHA-Behandlung mit einer Präinkubation des *Ductus thoracicus* mit blockierenden IL-6-

Antikörpern kombiniert werden und ein möglicher Einfluss dieser IL-6-Neutralisation auf das Auswachsen der Lymphgefäße analysiert werden.

Die Behandlung verschiedener Zelltypen mit sHA induziert eine Reihe unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege. Die Inkubation von Blutendothelzellen mit niedrigen sHA-Konzentrationen führte zur Aktivierung des ERK-Signalweges, was essentiell für die angiogenen Eigenschaften der Zellen ist (Slevin et al., 1998, 2002). Eine weitere zentrale Rolle in der Vermittlung sHA-induzierter Effekte spielt der NF- κ B-Signalweg. In Immun- und Tumorzellen führte eine Behandlung mit sHA zu einer Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern (Fitzgerald et al., 2000; Suzuki et al., 2002; Termeer et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Zellsignalwege durch eine Behandlung mit sHA in LECs aktiviert werden. In Zeitreihen wurde die Expression von Signalmolekülen, die bereits in anderen Zelltypen als Vermittler von sHA identifiziert wurden, wie z.B. ERK oder NF- κ B, in mit sHA behandelten LECs untersucht. Zusätzlich wurde die Suche auf Moleküle, wie z.B. ATF-2 oder p38, die bisher in diesem Zusammenhang noch nicht beschrieben wurden, ausgedehnt. Die Behandlung der LECs mit sHA erstreckte sich von wenigen Minuten bis mehrere Stunden, womit ein großes Zeitfenster abgedeckt wurde. Es konnte bislang allerdings kein Zellsignalweg oder Signalmolekül identifiziert werden, das durch eine Behandlung mit niedrigen sHA-Konzentrationen in LECs zuverlässig und reproduzierbar aktiviert wurde (Abbildung 12A und 12B). In parallel durchgeführten Proliferationsexperimenten wurde die Wirkung der sHA auf die LECs kontrolliert, womit auszuschließen ist, dass die fehlende Aktivierung der untersuchten Zellsignalwege auf eine mangelnde biologische Aktivität der sHA-Moleküle zurückzuführen ist. Zusätzlich wurden die LECs sowohl in Hunger- als auch in Normalmedium kultiviert, um einen optimalen Effekt der sHA zu gewährleisten.

Der pro-proliferative Effekt von sHA wird über den lymphatischen Marker LYVE-1 reguliert (Abbildung 8A und 8B). Da über die signalgebende Funktion dieses Rezeptors keine Erkenntnisse vorliegen, könnte nach einer Behandlung der LECs mit sHA in einem nächsten Schritt LYVE-1 isoliert, und die Phosphorylierung des Rezeptors näher untersucht werden. Dies könnte einen Aufschluss darüber geben, ob und welche Aminosäurereste von LYVE-1 intrazellulär phosphoryliert und damit aktiviert wurden. Basierend auf diesen Analysen könnten weitere Signalmoleküle näher untersucht werden. Mittels Massenspektroskopie könnten weitere Interaktionspartner von LYVE-1 identifiziert werden, die Aufschluss über

mögliche Signalwege geben könnten. Eine weitere Möglichkeit, sHA-vermittelte Signalwege in LECs zu untersuchen, wäre die Durchführung von Microarray-Analysen. Da jedoch noch kein genaues zeitliches Fenster für die Wirkung von sHA in LECs abzulesen ist, könnte sich diese Analyse als sehr aufwendig erweisen.

LECs sind in der Lage, HMW-HA zu internalisieren, wobei dieser Effekt unabhängig von LYVE-1 ist (Johnson et al., 2007). Es ist entsprechend zwar denkbar, dass sHA wie HMW-HA internalisiert wird, intrazellulär an potentielle Rezeptoren binden und das Verhalten der LECs regulieren könnte, eine LYVE-1-unabhängige Wirkung auf die Signaltransduktion der LECs ist allerdings eher unwahrscheinlich, da die pro-lymphangiogene Wirkung von sHA über eine extrazelluläre Interaktion mit LYVE-1 vermittelt wird (Abbildung 8A und 8B). Außerdem können sHA-Moleküle, die kovalent auf nanostrukturierten Oberflächen gekoppelt wurden, die Proliferation von LECs beeinflussen. Diese sHA-Moleküle können aufgrund ihrer Kopplung an der Oberfläche nicht internalisiert werden, verfügen dennoch über eine pro-proliferative Wirkung (Böhm, Wegner, Schön, Bauer et al., unveröffentlichte Daten). Demnach ist eine mögliche Internalisierung von sHA wahrscheinlich nicht essentiell für die pro-proliferative Wirkung an LECs, könnte allerdings eine Rolle bei der Vermittlung des anti-proliferativen Effekts hoher sHA-Konzentrationen spielen.

4.6 Die Wirkungsweise hoher sHA-Konzentrationen

Hohe sHA-Konzentrationen ab circa 20 µg/ml beeinflussen das Verhalten von LECs auf mehreren Ebenen. Proliferation, Migration und die Ausbildung gefäßartiger Strukturen von LECs werden signifikant inhibiert (Abbildung 2A-C, 3 und 4). Zusätzlich führt die Behandlung mit hohen sHA-Konzentrationen zu einem G1-Arrest im Zellzyklus der LECs (Abbildung 5) und die Zellen reagieren mit morphologischen Veränderungen und einer Herunterregulierung der lymphatischen Marker LYVE-1, Prox-1 und VEGFR-3 (Abbildung 15A-C). Welche molekularen Vorgänge vermitteln diese durch hohe sHA-Konzentrationen beobachteten Effekte auf das Verhalten und die Identität der LECs? Und wie verhält es sich mit der physiologischen Relevanz hoher sHA-Konzentrationen?

Auf- und Abbau von HA sind sehr dynamische Prozesse. Innerhalb eines Tages wird etwa ein Drittel der Gesamtmenge an HMW-HA im Organismus abgebaut (Fraser et al., 1981). Der Abtransport der HA erfolgt dabei unmittelbar über die Lymphbahnen, um eine Akkumulation der bioaktiven sHA-Moleküle in Geweben zu verhindern (Fraser und Laurent, 1989). In

gesundem Gewebe sind nur Spuren von sHA (wenige ng/ml) zu detektieren, während aus der interstitiellen Flüssigkeit verschiedener Tumore sHA in einer Konzentration von bis zu 6 µg/ml isoliert werden konnte (Klusmeier und Schmaus, unveröffentlichte Daten). Die in Tumoren gemessenen sHA-Konzentrationen reichen aus, um die Proliferation von LECs *in vitro* zu stimulieren und die Lymphangiogenese *ex vivo* und *in vivo* zu fördern (Bauer et al., in Vorbereitung). Höhere sHA-Konzentrationen konnten bislang *in vivo* nicht nachgewiesen werden, ihre Relevanz unter pathologischen Bedingungen kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. So könnten in Prozessen mit verstärkter HA-Abbaurate, wie in Entzündungsreaktionen, Wundheilungsprozessen oder Tumorwachstum, durch Störungen im sHA-Abtransport durchaus lokal hohe sHA-Konzentrationen von über 20 µg/ml existieren. Nach operativen Eingriffen, bei denen es zu Beschädigungen an lymphatischen Gefäßen kommt, sind häufig Lymphödeme in den betroffenen Gliedmaßen zu verzeichnen (Alitalo, 2011). Hier könnte es, aufgrund des Lymphstaus, zu einer Akkumulation der HA-Fragmente kommen. In Kollaborationen mit der Universitätsmedizin Mannheim wird von unserer Arbeitsgruppe zurzeit Lymphödemflüssigkeit von Patienten gesammelt, die anschließend auf ihre sHA-Konzentration hin untersucht werden soll. In Lymphödemflüssigkeit von Patienten und Mäusen wurde eine erhöhte TGF-β-1-Expression nachgewiesen, die stets mit einer Inhibierung der Lymphangiogenese einherging (Avraham et al., 2010a, 2010b). sHA induziert in LECs konzentrationsabhängig die Expression der anti-lymphogenen TGF-β-Isoformen 1, 2 und 3 (Schmaus, Doktorarbeit 2011). In Lymphödemem könnte somit eine Verbindung zwischen potentiell erhöhten sHA-Konzentrationen und den bereits nachgewiesenen hohen TGF-β-1-Konzentrationen bestehen.

Von TGF-β-1 ist bekannt, dass es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* anti-lymphangiogene Wirkung besitzt (Clavin et al., 2008; Oka et al., 2008; Avraham et al., 2010a, 2010b). Davon sind alle Prozesse der Lymphangiogenese wie Proliferation, Migration und Gefäßbildung betroffen (Clavin et al., 2008; Oka et al., 2008; Avraham et al., 2010a, 2010b). Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben einer anti-proliferativen Wirkung von TGF-β-1 erstmals auch eine konzentrationsabhängige hemmende Wirkung von TGF-β-2 und -3 auf die Proliferation von LECs beschrieben (Abbildung 13A). Im Hinblick darauf, dass sHA konzentrationsabhängig die Hochregulierung von TGF-β-1, -2 und -3 induzieren kann (Schmaus, Doktorarbeit 2011), könnte die in den funktionellen Experimenten beobachtete hemmende Wirkung hoher sHA-Konzentrationen auf die anti-lymphangiogene Wirkung der induzierten TGF-β-Isoformen zurückzuführen sein. Entsprechend führte die Neutralisierung der TGF-β-Isoformen durch

blockierende Antikörper zu einer Verstärkung des pro-proliferativen Effekts niedriger sHA-Konzentrationen und einer signifikanten Reduktion der anti-proliferativen Wirkung hoher sHA-Konzentrationen (Abbildung 13B). Neben der anti-proliferativen Wirkung hoher sHA-Konzentrationen könnte auch die bereits bei niedrigen sHA-Konzentrationen beobachtete Inhibierung der Migration und Gefäßbildung durch TGF- β vermittelt werden. sHA ist in der Lage, bereits in niedrigen Konzentrationen die Expression von TGF- β -1, -2 und -3 in LECs zu stimulieren (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Um die Relevanz von TGF- β in der durch sHA-induzierten Inhibierung der Migration und Gefäßbildung weiter zu untersuchen, könnten LECs in Migrationsassays und Tubule formation Assays mit neutralisierenden pan-TGF- β -Antikörpern behandelt werden. Falls TGF- β neben der anti-proliferativen Wirkung ebenfalls für die Hemmung der Migration und Gefäßbildung verantwortlich sein sollte, sollte diese Inhibierung durch den Einsatz der TGF- β -Antikörper abgeschwächt oder aufgehoben werden.

Die Behandlung von LECs mit hohen sHA-Konzentrationen führte zu einem signifikanten Anstieg an Zellen in der G1-Phase (Abbildung 5). Dieser könnte ebenfalls durch TGF- β vermittelt werden, da dieses Zytokin in der Lage ist, einen G1-Arrest in Endothelzellen und anderen Zelltypen zu induzieren (Petritsch et al., 2000; Mukherjee et al., 2010). Der induzierte G1-Arrest könnte zum Teil eine Erklärung für den bei hohen sHA-Konzentrationen beobachteten anti-proliferativen Effekt sein (Abbildung 2A). Jedoch übertrifft das Ausmaß des anti-proliferativen Effekts die Induktion des G1-Arrests durch hohe sHA-Konzentrationen in LECs deutlich. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die bei hohen sHA-Konzentrationen auftretende anti-proliferative Wirkung nicht nur durch einen G1-Arrest, sondern womöglich noch durch weitere Mechanismen wie Apoptose vermittelt wird.

Hohe sHA-Konzentrationen induzierten eine auffällige morphologische Veränderung von LECs (Abbildung 15A). Während die Zellen bei niedrigen sHA-Konzentrationen ihren endothelialen Phänotyp beibehielten, wurde bei hohen sHA-Konzentrationen ein Wandel zu einer fibroblastenähnlichen Morphologie beobachtet. Auch die Behandlung von LECs mit TGF- β führte bereits nach einigen Stunden zu einer deutlichen Veränderung der Zellmorphologie (Avraham et al., 2010b). Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch eine Behandlung mit den TGF- β -Isoformen 1, 2 und 3 jedoch nur geringfügige Änderungen in der Morphologie der LECs registriert werden, was unter Umständen auf eine geringere Sensitivität der LECs zurückzuführen sein könnte (Abbildung 15C). Um eine Verbindung zwischen sHA und TGF- β näher zu untersuchen, könnten die Auswirkungen einer TGF- β -

Blockade auf die durch hohe sHA-Konzentrationen vermittelten morphologischen Veränderungen untersucht werden.

Eine Behandlung mit hohen sHA-Konzentrationen bewirkte eine Herunterregulierung der lymphatischen Marker Prox-1, LYVE-1 und VEGFR-3 in LECs (Abbildung 15B und 15C). Im Hinblick darauf, dass hohe sHA-Konzentrationen die Expression von TGF- β -1, -2 und -3 in LECs induzieren (Schmaus, Doktorarbeit 2011), ist es interessant zu erwähnen, dass TGF- β -1 eine wichtige Funktion in der Regulation der sogenannten Endothelialen-Mesenchymalen Transition (EndoMT) besitzt (Zeisberg et al., 2007; Clavin et al., 2008). Diese ist durch einen Verlust lymphatischer Marker, eine Hochregulierung mesenchymaler Marker und eine Veränderung des endothelialen zu einem fibroblastenähnlichen Phänotyp gekennzeichnet (Oka et al., 2008; Avraham et al., 2010b; Zeisberg et al., 2007; Clavin et al., 2008). Ergänzend dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TGF- β -1, -2 und -3 in pathologisch relevanten Konzentrationen (Shim et al., 1999; Klusmeier, unveröffentlichte Daten) in der Lage sind, eine Herunterregulierung der lymphatischen Marker Prox-1, LYVE-1 und VEGFR-3 in LECs zu induzieren (Abbildung 14A und 14B). Hierbei verfügte TGF- β -2 über die stärkste Wirkung, was erstaunlich ist, da dieses Molekül in diesem Zusammenhang bislang noch nicht beschrieben wurde (Abbildung 14A und 14B). Bei einer Behandlung mit hohen TGF- β -3-Konzentrationen ist ein Anstieg der Expression von Prox-1 und LYVE-1 zu verzeichnen (Abbildung 14A). Dies sollte näher untersucht werden, ist eine Hochregulierung lymphatischer Marker durch eine TGF- β -3-Behandlung bislang noch nicht dokumentiert worden. Interessanterweise konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ein Verlust der Expression lymphatischer Marker nicht zwangsläufig mit einem Anstieg mesenchymaler Marker wie Vimentin einhergeht (Abbildung 14A und 14B).

Trotz der durch hohe sHA-Konzentrationen induzierten TGF- β -Expression und des nachgewiesenen Potentials der drei TGF- β -Isoformen, die Expression lymphatischer Marker negativ zu beeinflussen (Abbildung 14A und 14B), konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung von Prox-1, LYVE-1 und VEGFR-3 durch sHA allerdings unabhängig von TGF- β ist (Abbildung 15D). Somit ist es wahrscheinlich, dass zwei unabhängige Mechanismen existieren, die die Expression lymphatischer Marker negativ beeinflussen können. Die durch hohe sHA-Konzentrationen induzierte TGF- β -Expression vermittelt somit zwar den anti-proliferativen Effekt von sHA auf die LECs (Abbildung 13B), besitzt jedoch höchstwahrscheinlich keinen Effekt auf die Markerexpression. Um eine Rolle von TGF- β in

der sHA-vermittelten Herunterregulierung lymphatischer Marker endgültig ausschließen zu können, sollte *ex vivo* und *in vivo* eine Behandlung mit hohen sHA-Konzentrationen erfolgen, und die Auswirkung einer TGF- β -Blockade auf eine sHA-vermittelte Herunterregulierung der lymphatischen Marker untersucht werden.

Einen möglichen Vermittler in der sHA-induzierten Herunterregulierung lymphatischer Marker könnte der pro-lymphangiogene Faktor Angiopoetin-2 (Ang-2) darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass hohe sHA-Konzentrationen eine deutliche Herunterregulierung von Ang-2 in LECs induzieren (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Ang-2 spielt durch die Sensibilisierung der lymphatischen Gefäße gegenüber pro-inflammatorischer Stimuli eine wichtige Rolle in der Induktion der Lymphangiogenese (Yan et al., 2012). In der embryonalen Lymphangiogenese verfügt Ang-2 zudem über eine wichtige Funktion bei der Definierung und Differenzierung der lymphatischen Zellen (Shimoda, 2009). Die durch sHA-induzierte Herunterregulierung der Ang-2-Expression könnte somit eine Erklärung für den bei hohen sHA-Konzentrationen beobachteten Verlust der Expression von Prox-1, LYVE-1 und VEGFR-3 liefern. Zum anderen könnte die Inhibierung der Proliferation, Migration und Gefäßbildung durch hohe sHA-Konzentrationen zusätzlich auf eine durch sHA-induzierte niedrige Ang-2-Expression zurückgeführt werden. Um eine mögliche Rolle von Ang-2 in der sHA-vermittelten Regulation der lymphatischen Markerexpression näher zu untersuchen, könnte *in vitro* analysiert werden, ob eine Neutralisierung von Ang-2 eine Reduktion von Prox-1, LYVE-1 und VEGFR-3 induziert. Zum anderen könnte getestet werden, ob eine Behandlung mit Ang-2 die Herunterregulierung der lymphatischen Marker verhindert.

Neben einer sHA-induzierten Expression von TGF- β -1, -2 und -3 in LECs konnte zusätzlich eine sHA-vermittelte Expression von TGF- β -1 und -3 in Fibroblasten beobachtet werden (David-Raoudi et al., 2008). Fibroblasten spielen als Teil des Tumorstromas durch Ausschüttung pro-tumoraler Faktoren, wie z.B. TGF- β , eine essentielle Rolle in der Tumorprogression (Cai et al., 2012). Die Wirkung von TGF- β auf die Tumorprogression ist ambivalent. So verfügt dieses Zytokin in prä-malignen oder frühen Phasen über eine anti-tumorale, in späteren Phasen der Tumorentwicklung jedoch über pro-tumorale Wirkung (Xie et al., 2002; Massague et al., 2008). In der interstitiellen Flüssigkeit von Tumoren konnten bisher nur niedrige Konzentrationen von bis zu 6 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Bereits diese niedrigen sHA-Konzentrationen waren *in vitro* aber bereits

in der Lage, die Expression von TGF- β -1, -2 und -3 in LECs in geringem Ausmaß zu induzieren (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Im Tumorkontext wären diese niedrigen sHA-Konzentrationen höchstwahrscheinlich in der Lage, die Expression von TGF- β in LECs und anderen Stromazellen induzieren, was, abhängig vom Status der Tumorentwicklung, entweder pro-tumorale oder anti-tumorale Wirkungen hätte. Im Laufe der Tumorprogression könnten bedingt durch die zunehmende Tumormasse Störungen im Lymphfluss auftreten, die lokal eine Akkumulation von sHA bewirken könnten. Diese erhöhten sHA-Konzentrationen wären dann in der Lage, lokal die Expression von TGF- β in LECs, tumor-assoziierten Fibroblasten, Tumorzellen und anderen Stromazellen in deutlich höheren Konzentrationen zu induzieren. Diese erhöhten TGF- β -Konzentrationen könnten die Tumorprogression weiter unterstützen und durch die Induktion einer EMT Prozesse wie die Metastasierung fördern. So konnte gezeigt werden, dass ein erhöhtes TGF- β -1 Level im Serum von Patienten mit Colorektal-Karzinomen mit einer erhöhten Invasivität der Tumorzellen und einer gesteigerten Metastasierung einhergeht (Shim et al., 1999).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass hohe sHA-Konzentrationen durch die Induktion einer morphologischen Veränderung in LECs (Abbildung 15A), verbunden mit einer deutlichen Herunterregulierung der lymphatischen Marker Prox-1, LYVE-1 und VEGFR-3 (Abbildung 15B und 15C) eine Rolle in der Induktion einer EndoMT besitzen könnten. Die genauen Mechanismen müssen allerdings noch untersucht werden, konnte doch gezeigt werden, dass der Verlust der Markerexpression in LECs unabhängig von TGF- β erfolgt (Abbildung 15D).

4.7 LYVE-1 im Kontext sHA produzierender Tumore

Die pro-proliferative Wirkung von sHA auf die Lymphangiogenese wird über LYVE-1 vermittelt. In der tumorinterstitiellen Flüssigkeit (TIF) von 4T1-Tumoren finden sich pro-proliferativ wirksame sHA-Konzentrationen von ca. 1 μ g/ml (Schmaus, Doktorarbeit 2011). Welche Rolle spielt LYVE-1 im Kontext des murinen 4T1-Tumormodells?

Bei der vergleichenden Analyse der sHA-Konzentration in der TIF von 4T1-tragenden Wildtypmäusen und LYVE-1-KO-Tieren konnte in beiden Fällen eine Konzentration von ca. 1 μ g/ml nachgewiesen werden (Abbildung 16B). Das Fehlen von LYVE-1 hat also keinen Einfluss auf die Produktion oder den Abtransport von sHA im Tumor. Beim Tumorwachstum konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den Wildtyp- und LYVE-1-KO-Mäusen

beobachtet werden (Abbildung 16A). Aufgrund seiner Rolle in der Regulation des Lymphflusses hätte ein Fehlen von LYVE-1 den Abtransport der Tumorflüssigkeit und somit den hydrostatischen Druck innerhalb des Tumors beeinflussen können (Hou et al., 2011, 2012). Hieraus resultierend hätte man eine Veränderung im Tumorwachstum verglichen mit Wildtypmäusen erwarten können.

LYVE-1 wird hauptsächlich auf lymphatischen Gefäßen exprimiert, eine Expression auf einem Subtyp von Makrophagen konnte aber ebenfalls nachgewiesen werden (Schledzewski et al., 2006). Makrophagen spielen als Teil des Tumorstromas durch Sezernierung verschiedenster Faktoren eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Tumorwachstums (Fukuda et al., 2012). Basierend auf den nahezu identischen Tumorwachstumskurven der Wildtyp- und LYVE-1-KO-Mäuse lässt sich mutmaßen, dass LYVE-1-positive Makrophagen entweder nicht am Tumorwachstum beteiligt sind oder eine fehlende Expression von LYVE-1 auf der Oberfläche dieser Zellen keinen Einfluss auf ihr Verhalten im Tumorkontext hat. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass LYVE-1 keinen Einfluss auf das Tumorwachstum von 4T1-Zellen hat. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass sich das Wachstum von Melanomen und Lungenkarzinomen in Wildtyp- und LYVE-1-KO-Mäusen nicht signifikant unterscheidet (Gale et al., 2007).

Auch in puncto Lungenmetastasierung konnten keine Unterschiede zwischen 4T1-tragenden Wildtyp- und LYVE-1-KO-Mäusen festgestellt werden (Abbildung 16D). Dies ist der erste Tierversuch der zeigt, dass LYVE-1 keinen Einfluss auf die Metastasierung zu vom Primärtumor entfernten Organen hat. Um eine genauere Aussage über die Relevanz von LYVE-1 in der systemischen Metastasierung treffen zu können, könnten weitere Tumorzelllinien in LYVE-1-KO- und Wildtypmäuse injiziert werden.

Die ipsilateralen axillaren Lymphknoten der 4T1-tragenden LYVE-1-KO-Mäuse waren signifikant kleiner als der Lymphknoten der Wildtypmäuse (Abbildung 16C). Dabei könnte es sich um invasive Tumorzellen oder eine durch den Tumor induzierte entzündliche Reaktion handeln. Aufgrund der hohen Metastasierungsrate der 4T1-Zellen kann jedoch mit einiger Wahrscheinlichkeit von einer Lymphknotenmetastasierung ausgegangen werden. Ein Fehlen von LYVE-1 scheint somit entweder Entzündungsreaktionen oder die Metastasierung zu regionalen Lymphknoten zu hemmen.

4.8 sHA in der lymphangiogenen Therapie

Lymphangiogenese spielt eine zentrale Rolle bei Entzündungsreaktionen, Lymphödemen und der Tumormetastasierung (Alitalo und Carmeliet, 2002; Sleeman und Thiele, 2009; Albrecht und Christofori, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit sHA ein neuer, bislang unbekannter lymphangiogener Faktor identifiziert und seine Wirkungsweise beschrieben. Es stellt sich nun die Frage, ob und wie die Eigenschaften von sHA genutzt werden können, um im Rahmen einer lymphangiogenen Therapie gezielt das Wachstum von Lymphgefäßen nach Bedarf zu fördern oder zu hemmen.

sHA vermittelt einen größen- und konzentrationsabhängigen Effekt auf funktionale Eigenschaften von LECs. Welche chemischen Strukturen oder funktionellen Gruppen der sHA-Moleküle diese Wirkungen vermitteln, ist noch nicht abschließend geklärt. Im Rahmen einer Kollaboration mit dem Institut für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie und dem Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme sollen aus einem sHA-Grundbaustein sHA-Derivate mit unterschiedlichen Schutzgruppen synthetisiert werden, die gezielt deprotektiert werden können. Einige dieser modifizierten sHA-Moleküle wurden bereits auf ihre biologische Aktivität getestet. Thiolierte sHA-Moleküle sind trotz ihrer chemischen Modifizierung am reduzierenden Ende in der Lage, einen biphasischen Effekt auf die Proliferation von LECs zu vermitteln, vergleichbar mit nativer sHA (Daten nicht gezeigt). Hieraus kann man schließen, dass das reduzierende Ende der sHA-Moleküle nicht für die Vermittlung des biphasischen Effektes verantwortlich ist. Mit der gezielten Modifikation weiterer funktioneller Gruppen sollen in der Zukunft die chemischen Strukturen identifiziert werden, die den lymphangiogenen Effekt von sHA vermitteln. Die Fähigkeit der modifizierten sHA-Moleküle, die Lymphangiogenese *in vivo* zu beeinflussen, soll durch eine Injektion in mit 4T1-Zellen implantierten Mäuse untersucht werden. Modifizierte sHA-Moleküle, die im Vergleich mit nativer sHA eine verringerte biologische Aktivität aufweisen, könnten um die Bindung an LYVE-1 konkurrieren und somit möglicherweise als Inhibitor eingesetzt werden. Zusätzlich könnten solche sHA-Moleküle mit Hyaluronidasen interagieren, und als eine Art Hemmstoff fungieren. Solche sHA-Inhibitoren könnten auch *in vivo* bei der anti-lymphangiogenen Tumorthherapie Verwendung finden, indem sie die Lymphangiogenese hemmen und somit die Metastasierung invasiver Tumorzellen reduzieren könnten. Modifizierte sHA-Moleküle mit deutlich erhöhter biologischer Aktivität könnten bei der Behandlung von Lymphödemen Verwendung finden. Ihre Verabreichung könnte gezielt

die Lymphangiogenese stimulieren, den Abtransport der gestauten Lympflüssigkeit dadurch fördern und das Anschwellen der betroffenen Körperregionen ermöglichen.

Neben der chemischen Struktur eines Liganden spielt auch dessen räumliche Anordnung eine wichtige Rolle bei der Effektivität der rezeptorvermittelnden Signalübertragung. Die räumliche Anordnung thiolierter Peptide auf einer nanostrukturierten Oberfläche beeinflusst die Ausbildung fokaler Adhäsionsstrukturen (Arnold et al., 2009). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die räumliche Anordnung von sHA-Molekülen einen Einfluss auf das Verhalten CD44-exprimierender Tumorzellen besitzt (Kaindl et al., 2012). Durch eine gezielte räumliche Orientierung und Ausrichtung von sHA-Molekülen könnte auch das Verhalten von LECs gesteuert werden. In einer Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme werden nanostrukturierte Oberflächen entworfen, die gezielt mit sHA-Derivaten modifiziert werden können. Diese mit sHA-gekoppelten Oberflächen sollen in Form von Implantaten in der lymphangiogenen Therapie eingesetzt werden. Ein Vorteil dieser Oberflächen wäre eine durch die Kopplung an die Implantate ermöglichte langfristige Darbietung von sHA-Molekülen im gewünschten Gewebe, eine optimierte Ausrichtung der sHA-Moleküle zueinander und zu ihren zellulären Rezeptoren sowie die Möglichkeit zur Verwendung chemisch modifizierter sHA-Derivate. Nanostrukturierte Hydrogele könnten zusätzlich als bioabbaubare Gerüststrukturen eingesetzt werden, wobei die Modifizierung dieser Hydrogele mit sHA zu einer gezielten und dosierten Freisetzung von sHA in das umgebende Gewebe führen könnte.

Durch eine über Thiol-Gruppen vermittelte Kopplung der sHA-Moleküle an Goldnanopartikel können die HA-Fragmente in genau definierten Abständen zueinander auf den Oberflächen positioniert werden. Zur Verringerung unspezifischer Bindungen von Proteinen oder Zellen an die Oberflächen werden diese mit Polyethylenglykol (PEG) beschichtet. Die Beschichtung der nanostrukturierten Glasoberflächen mit zyklischen RGD-Peptiden (cRGD) führt zu einer erhöhten Bindungsspezifität von LECs an die Oberflächen. Die Interaktion der cRGD-Peptide wird über β 1-Integrine vermittelt, die an der Oberfläche der LECs exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). An nanostrukturierte Glasoberflächen gekoppelte sHA-Moleküle können zudem die Proliferation von LECs beeinflussen. Mit zunehmendem Abstand der sHA-Moleküle zueinander ist ein Anstieg in der Adhäsion und Proliferation der Zellen zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die durch sHA-induzierte Proliferation von LECs nicht über eine Internalisierung von sHA vermittelt wird.

Zudem besitzt die räumliche Anordnung der sHA-Moleküle einen Einfluss auf ihre proliferativen Eigenschaften.

Die Wirkung lymphangiogener Faktoren kann durch die Verabreichung löslicher Rezeptorglobuline aufgehoben werden (He et al., 2002; Krishnan et al., 2003; Burton et al., 2008b). Eine Inhibierung der Wirkung von sHA könnte durch die Verwendung eines löslichen LYVE-1-Rezeptorglobulins erreicht werden. LYVE-1-Rezeptorglobuline sollten *in vivo* fähig sein, im Tumorkontext oder in Entzündungsreaktionen entstandene sHA-Moleküle zu binden und damit zu neutralisieren. Im 4T1-Tumormodell konnte bisher keine Wirkung dieser LYVE-1-Rezeptorglobuline auf die Metastasierung oder das Tumorwachstum festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um diese Daten allerdings umfassend interpretieren zu können, sollten die Bindungseigenschaften und Sialisierungen der LYVE-1-Rezeptorglobuline jedoch noch genauer charakterisiert werden.

In dieser Arbeit konnten niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente als neue lymphangiogene Faktoren identifiziert und charakterisiert werden. Abhängig von ihrer Konzentration sind sie in der Lage, die Eigenschaften und die Identität von LECs zu beeinflussen. Die molekularen Wirkungsweisen dieser HA-Fragmente wurden beschrieben, wobei noch eine Reihe von Untersuchungen nötig ist, um das vollständige Potential dieser Moleküle in der Behandlung pathologischer Prozesse zu erschließen.

Literaturverzeichnis

Abooghalia, A.H. (2006). Elevation of hyaluronidase-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 helps select bladder cancer patients at risk of invasion. *Arch. Med. Res.* 37, 109–116.

Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E., Mäkinen, T., Vitali, A., Wilks, A.F., Alitalo, K. and Stackel, S.A. (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 548–553.

Agren, U.M., Tammi, R.H. and Tammi, M.I. (1997). Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 996–1001.

Alaniz, L., García, M.G., Gallo-Rodriguez, C., Agusti, R., Sterín-Speziale, N., Hajos, S.E. and Alvarez, E. (2006). Hyaluronan oligosaccharides induce cell death through PI3-K/Akt pathway independently of NF-kappaB transcription factor. *Glycobiology* 16, 359–367.

Albrecht, I. and Christofori, G. (2011). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 483–494.

Alders, M., Hogan, B.M., Gjini, E., Salehi, F., Al-Gazali, L., Hennekam, E.A., Holmberg, E.E., Mannens, M.M.A.M., Mulder, M.F., Offerhaus, G.J.A., Prescott, T.E., Schroor, E.J., Verheij, J.B., Witte, M., Zwijnenburg, P.J., Vikkula, M., Schulte-Merker, S. and Hennekam, R.C. (2009). Mutations in CCBE1 cause generalized lymph vessel dysplasia in humans. *Nat. Genet.* 41, 1272–1274.

Alitalo, K. (2011). The lymphatic vasculature in disease. *Nat. Med.* 17, 1371–1380.

Alitalo, K. and Carmeliet, P. (2002). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 1, 219–227.

Al-Rawi, M.A.A., Watkins, G., Mansel, R.E. and Jiang, W.G. (2005). Interleukin 7 upregulates vascular endothelial growth factor D in breast cancer cells and induces lymphangiogenesis in vivo. *Br J Surg* 92, 305–310.

Arnold, M., Schwieder, M., Blümmel, J., Cavalcanti-Adam, E.A., López-García, M., Kessler, H., Geiger, B. and Spatz, J.P. (2009). Cell interactions with hierarchically structured nano-patterned adhesive surfaces. *Soft Matter* 5, 72–77.

Aslakson, C.J. and Miller, F.R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 52, 1399–1405.

Avraham, T., Daluvoy, S., Zampell, J., Yan, A., Haviv, Y.S., Rockson, S.G. and Mehrara, B.J. (2010a). Blockade of transforming growth factor-beta1 accelerates lymphatic regeneration during wound repair. *Am. J. Pathol.* 177, 3202–3214.

Avraham, T., Yan, A., Zampell, J.C., Daluvoy, S.V., Haimovitz-Friedman, A., Cordeiro, A.P. and Mehrara, B.J. (2010b). Radiation therapy causes loss of dermal lymphatic vessels and

interferes with lymphatic function by TGF-beta1-mediated tissue fibrosis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *299*, C589–605.

Balazs, E.A., Watson, D., Duff, I.F. and Roseman, S. (1967). Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritis human fluids. *Arthritis Rheum.* *10*, 357–376.

Baluk, P., Fuxe, J., Hashizume, H., Romano, T., Lashnits, E., Butz, S., Vestweber, D., Corada, M., Molendini, C., Dejana, E. and McDonald, D.M. (2007). Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J. Exp. Med.* *204*, 2349–2362.

Baluk, P., Tammela, T., Ator, E., Lyubynska, N., Achen, M.G., Hicklin, D.J., Jeltsch, M., Petrova, T.V., Pytowski, B., Stacker, S.A., Ylä-Herttuala, S., Jackson, D.G., Alitalo, K., McDonald, D.M. (2005). Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* *115*, 247–257.

Banerji, S., Day, A.J., Kahmann, J.D. and Jackson, D.G. (1998). Characterization of a functional hyaluronan-binding domain from the human CD44 molecule expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* *14*, 371–381.

Banerji, S., Hide, B.R.S., James, J.R., Noble, M.E.M. and Jackson, D.G. (2010). Distinctive properties of the hyaluronan-binding domain in the lymphatic endothelial receptor Lyve-1 and their implications for receptor function. *J. Biol. Chem.* *285*, 10724–10735.

Banerji, S., Ni, J., Wang, S.X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M. and Jackson, D.G. (1999). LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J. Cell Biol.* *144*, 789–801.

Banerji, S., Wright, A.J., Noble, M., Mahoney, D.J., Campbell, I.D., Day, A.J. and Jackson, D.G. (2007). Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 234–239.

Banziger-Tobler, N.E., Halin, C., Kajiya, K. and Detmar, M. (2008). Growth hormone promotes lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* *173*, 586–597.

Bazigou, E., Xie, S., Chen, C., Weston, A., Miura, N., Sorokin, L., Adams, R., Muro, A.F., Sheppard, D. and Makinen, T. (2009). Integrin-alpha9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis. *Dev. Cell* *17*, 175–186.

Beech, D.J., Madan, A.K. and Deng, N. (2002). Expression of PH-20 in normal and neoplastic breast tissue. *J. Surg. Res.* *103*, 203–207.

Bertozzi, C.C., Hess, P.R. and Kahn, M.L. (2010). Platelets: covert regulators of lymphatic development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 2368–2371.

Bharadwaj, A.G., Kovar, J.L., Loughman, E., Elowsky, C., Oakley, G.G. and Simpson, M.A. (2009). Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing. *Am. J. Pathol.* *174*, 1027–1036.

Biswas, S., Chytil, A., Washington, K., Romero-Gallo, J., Gorska, A.E., Wirth, P.S., Gautam, S., Moses, H.L. and Grady, W.M. (2004). Transforming growth factor beta receptor type II

inactivation promotes the establishment and progression of colon cancer. *Cancer Res.* 64, 4687–4692.

Björndahl, M., Cao, R., Nissen, L.J., Clasper, S., Johnson, L.A., Xue, Y., Zhou, Z., Jackson, D., Hansen, A.J. and Cao, Y. (2005). Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15593–15598.

Boensch, C., Huang, S.S., Connolly, D.T. and Huang, J.S. (1999). Cell surface retention sequence binding protein-1 interacts with the v-sis gene product and platelet-derived growth factor beta-type receptor in simian sarcoma virus-transformed cells. *J. Biol. Chem.* 274, 10582–10589.

Boensch, C., Kuo, M.D., Connolly, D.T., Huang, S.S. and Huang, J.S. (1995). Identification, purification, and characterization of cell-surface retention sequence-binding proteins from human SK-Hep cells and bovine liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 270, 1807–1816.

Botto, S., Streblov, D.N., DeFilippis, V., White, L., Kreklywich, C.N., Smith, P.P. and Caposio, P. (2011). IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin. *Blood* 117, 352–361.

Brideau, G., Mäkinen, M.J., Elamaa, H., Tu, H., Nilsson, G., Alitalo, K., Pihlajaniemi, T. and Heljasvaara, R. (2007). Endostatin overexpression inhibits lymphangiogenesis and lymph node metastasis in mice. *Cancer Res.* 67, 11528–11535.

Brinck, J. and Heldin, P. (1999). Expression of recombinant hyaluronan synthase (HAS) isoforms in CHO cells reduces cell migration and cell surface CD44. *Exp. Cell Res.* 252, 342–351.

Burton, J.B., Priceman, S.J., Sung, J.L., Brakenhielm, E., An, D.S., Pytowski, B., Alitalo, K. and Wu, L. (2008). Suppression of prostate cancer nodal and systemic metastasis by blockade of the lymphangiogenic axis. *Cancer Res.* 68, 7828–7837.

Cai, J., Tang, H., Xu, L., Wang, X., Yang, C., Ruan, S., Guo, J., Hu, S. and Wang, Z. (2012). Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. *Carcinogenesis* 33, 20–29.

Camenisch, T.D., Spicer, A.P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M.L., Calabro, A., Jr, Kubalak, S., Klewer, S.E. and McDonald, J.A. (2000). Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J. Clin. Invest.* 106, 349–360.

Campo, G.M., Avenoso, A., Campo, S., D'Ascola, A., Nastasi, G. and Calatroni, A. (2010). Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 80, 480–490.

Cao, R., Björndahl, M.A., Religa, P., Clasper, S., Garvin, S., Galter, D., Meister, B., Ikomi, F., Tritsaris, K., Dissing, S., Ohhashi, T., Jackson, D.G. and Cao, Y. (2004). PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell* 6, 333–345.

- Carramolino, L., Fuentes, J., García-Andrés, C., Azcoitia, V., Riethmacher, D. and Torres, M. (2010). Platelets play an essential role in separating the blood and lymphatic vasculatures during embryonic angiogenesis. *Circ. Res.* *106*, 1197–1201.
- Caunt, M., Mak, J., Liang, W.-C., Stawicki, S., Pan, Q., Tong, R.K., Kowalski, J., Ho, C., Reslan, H.B., Ross, J., Berry, L., Kasman, I., Zlot, C., Cheng, Z., Le Couter, J., Filvaroff, E.H., Plowman, G., Peale, F., French, D., Carano, R., Koch, A.W., Wu, Y., Watts, R.J., Tessier-Lavigne, M. and Baqri, A. (2008). Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* *13*, 331–342.
- Chajara, A., Raoudi, M., Delpech, B., Leroy, M., Basuyau, J.P. and Levesque, H. (2000). Increased hyaluronan and hyaluronidase production and hyaluronan degradation in injured aorta of insulin-resistant rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20*, 1480–1487.
- Chang, L.K., Garcia-Cardena, G., Farnebo, F., Fannon, M., Chen, E.J., Butterfield, C., Moses, M.A., Mulligan, R.C., Folkman, J. and Kaipainen, A. (2004). Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 11658–11663.
- Chen, X., Xie, Q., Cheng, X., Diao, X., Cheng, Y., Liu, J., Xie, W., Chen, Z. and Zhu, B. (2010). Role of interleukin-17 in lymphangiogenesis in non-small-cell lung cancer: Enhanced production of vascular endothelial growth factor C in non-small-cell lung carcinoma cells. *Cancer Sci.* *101*, 2384–2390.
- Chen, Z., Varney, M.L., Backora, M.W., Cowan, K., Solheim, J.C., Talmadge, J.E. and Singh, R.K. (2005). Down-regulation of vascular endothelial cell growth factor-C expression using small interfering RNA vectors in mammary tumors inhibits tumor lymphangiogenesis and spontaneous metastasis and enhances survival. *Cancer Res.* *65*, 9004–9011.
- Cherr, G.N., Yudin, A.I. and Overstreet, J.W. (2001). The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol.* *20*, 515–525.
- Clavin, N.W., Avraham, T., Fernandez, J., Daluvoy, S.V., Soares, M.A., Chaudhry, A. and Mehrara, B.J. (2008). TGF-beta1 is a negative regulator of lymphatic regeneration during wound repair. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *295*, H2113–2127.
- Cordo Russo, R.I., García, M.G., Alaniz, L., Blanco, G., Alvarez, E. and Hajos, S.E. (2008). Hyaluronan oligosaccharides sensitize lymphoma resistant cell lines to vincristine by modulating P-glycoprotein activity and PI3K/Akt pathway. *Int. J. Cancer* *122*, 1012–1018.
- Csoka, A.B., Frost, G.I. and Stern, R. (2001). The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* *20*, 499–508.
- Cui, X., Xu, H., Zhou, S., Zhao, T., Liu, A., Guo, X., Tang, W. and Wang, F. (2009). Evaluation of angiogenic activities of hyaluronan oligosaccharides of defined minimum size. *Life Sci.* *85*, 573–577.
- Dahl, L.B., Dahl, I.M., Engström-Laurent, A. and Granath, K. (1985). Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann. Rheum. Dis.* *44*, 817–822.

- David-Raoudi, M., Tranchepain, F., Deschrevel, B., Vincent, J.-C., Bogdanowicz, P., Boumediene, K. and Pujol, J.-P. (2008). Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen* 16, 274–287.
- Davidson, L.A., Marsden, M., Keller, R. and Desimone, D.W. (2006). Integrin alpha5beta1 and fibronectin regulate polarized cell protrusions required for *Xenopus* convergence and extension. *Curr. Biol.* 16, 833–844.
- Day, T.D. (1950). Connective tissue permeability and the mode of action of hyaluronidase. *Nature* 166, 785–786.
- DeAngelis, P.L., Papaconstantinou, J. and Weigel, P.H. (1993). Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* 268, 19181–19184.
- Deed, R., Rooney, P., Kumar, P., Norton, J.D., Smith, J., Freemont, A.J. and Kumar, S. (1997). Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *Int. J. Cancer* 71, 251–256.
- Derynck, R. and Akhurst, R.J. (2007). Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat. Cell Biol.* 9, 1000–1004.
- English, N.M., Lesley, J.F. and Hyman, R. (1998). Site-specific de-N-glycosylation of CD44 can activate hyaluronan binding, and CD44 activation states show distinct threshold densities for hyaluronan binding. *Cancer Res.* 58, 3736–3742.
- Evanko, S.P., Angello, J.C. and Wight, T.N. (1999). Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1004–1013.
- Evanko, S.P. and Wight, T.N. (1999). Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1331–1342.
- Fernández, M.I., Bolenz, C., Trojan, L., Steidler, A., Weiss, C., Alken, P., Grobholz, R. and Michel, M.S. (2008). Prognostic implications of lymphangiogenesis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur. Urol.* 53, 571–578.
- Fieber, C., Baumann, P., Vallon, R., Termeer, C., Simon, J.C., Hofmann, M., Angel, P., Herrlich, P. and Sleeman, J.P. (2004). Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. *J. Cell. Sci.* 117, 359–367.
- Fiorentini, S., Luganini, A., Dell’Oste, V., Lorusso, B., Cervi, E., Caccuri, F., Bonardelli, S., Landolfo, S., Caruso, A. and Gribaudo, G. (2011). Human cytomegalovirus productively infects lymphatic endothelial cells and induces a secretome that promotes angiogenesis and lymphangiogenesis through interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Gen. Virol.* 92, 650–660.
- Fitzgerald, K.A., Bowie, A.G., Skeffington, B.S. and O’Neill, L.A. (2000). Ras, protein kinase C zeta, and I kappa B kinases 1 and 2 are downstream effectors of CD44 during the

activation of NF-kappa B by hyaluronic acid fragments in T-24 carcinoma cells. *J. Immunol.* *164*, 2053–2063.

Flister, M.J., Wilber, A., Hall, K.L., Iwata, C., Miyazono, K., Nisato, R.E., Pepper, M.S., Zawieja, D.C. and Ran, S. (2010). Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF-kappaB and Prox1. *Blood* *115*, 418–429.

Franchi, A., Gallo, O., Massi, D., Baroni, G. and Santucci, M. (2004). Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* *101*, 973–978.

François, M., Caprini, A., Hosking, B., Orsenigo, F., Wilhelm, D., Browne, C., Paavonen, K., Karnezis, T., Shayan, R., Downes, M., Davidson, T., Tutt, D., Cheah, K.S., Stacker, S.A., Muscat, G.E., Achen, M.G., Dejana, E. and Koopman, P. (2008). Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature* *456*, 643–647.

Frantz, C., Stewart, K.M. and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell. Sci.* *123*, 4195–4200.

Fraser, J.R. and Laurent, T.C. (1989). Turnover and metabolism of hyaluronan. *Ciba Found. Symp.* *143*, 41–53; discussion 53–59, 281–285.

Fraser, J.R., Laurent, T.C., Pertoft, H. and Baxter, E. (1981). Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem. J.* *200*, 415–424.

Frost, G.I., Csóka, A.B., Wong, T., Stern, R. and Csóka, T.B. (1997). Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *236*, 10–15.

Fukuda, K., Kobayashi, A. and Watabe, K. (2012). The role of tumor-associated macrophage in tumor progression. *Front Biosci (Schol Ed)* *4*, 787–798.

Gale, N.W., Prevo, R., Espinosa, J., Ferguson, D.J., Dominguez, M.G., Yancopoulos, G.D., Thurston, G. and Jackson, D.G. (2007). Normal lymphatic development and function in mice deficient for the lymphatic hyaluronan receptor LYVE-1. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 595–604.

Gallatin, W.M., Weissman, I.L. and Butcher, E.C. (2006). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. 1983. *J. Immunol.* *177*, 5–9.

Gao, F., Liu, Y., He, Y., Yang, C., Wang, Y., Shi, X. and Wei, G. (2010). Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis. *Matrix Biol.* *29*, 107–116.

Gao, F., Yang, C.X., Mo, W., Liu, Y.W. and He, Y.Q. (2008). Hyaluronan oligosaccharides are potential stimulators to angiogenesis via RHAMM mediated signal pathway in wound healing. *Clin Invest Med* *31*, E106–116.

Garcion, E., Halilagic, A., Faissner, A. and French-Constant, C. (2004). Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* *131*, 3423–3432.

- Gariboldi, S., Palazzo, M., Zanobbio, L., Selleri, S., Sommariva, M., Sfondrini, L., Cavicchini, S., Balsari, A. and Rumio, C. (2008). Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of beta-defensin 2 via TLR2 and TLR4. *J. Immunol.* *181*, 2103–2110.
- Gonzalez-Angulo, A.M., Morales-Vasquez, F. and Hortobagyi, G.N. (2007). Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* *608*, 1–22.
- Gordon, E.J., Gale, N.W. and Harvey, N.L. (2008). Expression of the hyaluronan receptor LYVE-1 is not restricted to the lymphatic vasculature; LYVE-1 is also expressed on embryonic blood vessels. *Dev. Dyn.* *237*, 1901–1909.
- Gu, B., Alexander, J.S., Gu, Y., Zhang, Y., Lewis, D.F. and Wang, Y. (2006). Expression of lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) in the human placenta. *Lymphat Res Biol* *4*, 11–17.
- Hamrah, P., Chen, L., Zhang, Q. and Dana, M.R. (2003). Novel expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 and VEGF-C on corneal dendritic cells. *Am. J. Pathol.* *163*, 57–68.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* *86*, 353–364.
- Harada, K., Yamazaki, T., Iwata, C., Yoshimatsu, Y., Sase, H., Mishima, K., Morishita, Y., Hirashima, M., Oike, Y., Suda, T., Miura, N., Watabe, T. and Miyazono, K. (2009). Identification of targets of Prox1 during in vitro vascular differentiation from embryonic stem cells: functional roles of HoxD8 in lymphangiogenesis. *J. Cell. Sci.* *122*, 3923–3930.
- Hardingham, T.E. and Muir, H. (1972). The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta* *279*, 401–405.
- Haslinger, B., Mandl-Weber, S., Sellmayer, A. and Sitter, T. (2001). Hyaluronan fragments induce the synthesis of MCP-1 and IL-8 in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Cell Tissue Res.* *305*, 79–86.
- Hayen, W., Goebeler, M., Kumar, S., Riessen, R. and Nehls, V. (1999). Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *J. Cell. Sci.* *112* (Pt 13), 2241–2251.
- Haziot, A., Ferrero, E., Köntgen, F., Hijiya, N., Yamamoto, S., Silver, J., Stewart, C.L. and Goyert, S.M. (1996). Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* *4*, 407–414.
- He, Y., Kozaki, K.-I., Karpanen, T., Koshikawa, K., Yla-Herttuala, S., Takahashi, T. and Alitalo, K. (2002). Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 819–825.
- He, Y., Rajantie, I., Pajusola, K., Jeltsch, M., Holopainen, T., Yla-Herttuala, S., Harding, T., Jooss, K., Takahashi, T. and Alitalo, K. (2005). Vascular endothelial cell growth factor

receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res.* *65*, 4739–4746.

Heldin, C.H. and Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* *79*, 1283–1316.

Heldin, P., Laurent, T.C. and Heldin, C.H. (1989). Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem. J.* *258*, 919–922.

Hemming, R., Martin, D.C., Slominski, E., Nagy, J.I., Halayko, A.J., Pind, S. and Triggs-Raine, B. (2008). Mouse Hyal3 encodes a 45- to 56-kDa glycoprotein whose overexpression increases hyaluronidase 1 activity in cultured cells. *Glycobiology* *18*, 280–289.

Hirakawa, S., Kodama, S., Kunstfeld, R., Kajiya, K., Brown, L.F. and Detmar, M. (2005). VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J. Exp. Med.* *201*, 1089–1099.

Hirose, Y., Saijou, E., Sugano, Y., Takeshita, F., Nishimura, S., Nonaka, H., Chen, Y.-R., Sekine, K., Kido, T., Nakamura, T., Nagai, R., Ochija, T. and Miyajima, A. (2012). Inhibition of Stabilin-2 elevates circulating hyaluronic acid levels and prevents tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 4263–4268.

Hodge-Dufour, J., Noble, P.W., Horton, M.R., Bao, C., Wysoka, M., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Trinchieri, G. and Puré, E. (1997). Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J. Immunol.* *159*, 2492–2500.

Hogan, B.M., Bos, F.L., Bussmann, J., Witte, M., Chi, N.C., Duckers, H.J. and Schulte-Merker, S. (2009). *Ccbe1* is required for embryonic lymphangiogenesis and venous sprouting. *Nat. Genet.* *41*, 396–398.

Horton, M.R., Boodoo, S. and Powell, J.D. (2002). NF-kappa B activation mediates the cross-talk between extracellular matrix and interferon-gamma (IFN-gamma) leading to enhanced monokine induced by IFN-gamma (MIG) expression in macrophages. *J. Biol. Chem.* *277*, 43757–43762.

Horton, M.R., Shapiro, S., Bao, C., Lowenstein, C.J. and Noble, P.W. (1999). Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *J. Immunol.* *162*, 4171–4176.

Hoshida, T., Isaka, N., Hagendoorn, J., di Tomaso, E., Chen, Y.-L., Pytowski, B., Fukumura, D., Padera, T.P. and Jain, R.K. (2006). Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications. *Cancer Res.* *66*, 8065–8075.

Hosono, K., Nishida, Y., Knudson, W., Knudson, C.B., Naruse, T., Suzuki, Y. and Ishiguro, N. (2007). Hyaluronan oligosaccharides inhibit tumorigenicity of osteosarcoma cell lines MG-63 and LM-8 in vitro and in vivo via perturbation of hyaluronan-rich pericellular matrix of the cells. *Am. J. Pathol.* *171*, 274–286.

- Hou, W.-H., Liu, I.-H., Tsai, C.C., Johnson, F.E., Huang, S.S. and Huang, J.S. (2011). CRSBP-1/LYVE-1 ligands disrupt lymphatic intercellular adhesion by inducing tyrosine phosphorylation and internalization of VE-cadherin. *J. Cell. Sci.* *124*, 1231–1244.
- Hou, W.-H., Liua, I.-H., Huang, S.S. and Huang, J.S. (2012). CRSBP-1/LYVE-1 ligands stimulate contraction of the CRSBP-1-associated ER network in lymphatic endothelial cells. *FEBS Lett.* *586*, 1480–1487.
- Hua, H., Li, M., Luo, T., Yin, Y. and Jiang, Y. (2011). Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 3853–3868.
- Huang, S.S., Liu, I.-H., Smith, T., Shah, M.R., Johnson, F.E. and Huang, J.S. (2006). CRSBP-1/LYVE-1-null mice exhibit identifiable morphological and functional alterations of lymphatic capillary vessels. *FEBS Lett.* *580*, 6259–6268.
- Huang, S.S., Tang, F.-M., Huang, Y.-H., Liu, I.-H., Hsu, S.-C., Chen, S.-T. and Huang, J.S. (2003). Cloning, expression, characterization, and role in autocrine cell growth of cell surface retention sequence binding protein-1. *J. Biol. Chem.* *278*, 43855–43869.
- Huggenberger, R., Siddiqui, S.S., Brander, D., Ullmann, S., Zimmermann, K., Antsiferova, M., Werner, S., Alitalo, K. and Detmar, M. (2011). An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation. *Blood* *117*, 4667–4678.
- Huijbers, I.J., Irvani, M., Popov, S., Robertson, D., Al-Sarraj, S., Jones, C. and Isacke, C.M. (2010). A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion. *PLoS ONE* *5*, e9808.
- Ichikawa, T., Itano, N., Sawai, T., Kimata, K., Koganehira, Y., Saida, T. and Taniguchi, S. (1999). Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* *113*, 935–939.
- Ichise, H., Ichise, T., Ohtani, O. and Yoshida, N. (2009). Phospholipase Cgamma2 is necessary for separation of blood and lymphatic vasculature in mice. *Development* *136*, 191–195.
- Issa, A., Le, T.X., Shoushtari, A.N., Shields, J.D. and Swartz, M.A. (2009). Vascular endothelial growth factor-C and C-C chemokine receptor 7 in tumor cell-lymphatic cross-talk promote invasive phenotype. *Cancer Res.* *69*, 349–357.
- Iwata, C., Kano, M.R., Komuro, A., Oka, M., Kiyono, K., Johansson, E., Morishita, Y., Yashiro, M., Hirakawa, K., Kaminishi, M. and Miyazono, K. (2007). Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis via reduction of lymphangiogenesis. *Cancer Res.* *67*, 10181–10189.
- Jackson, D.G. (2009). Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics. *Immunol. Rev.* *230*, 216–231.
- Jackson, D.G., Prevo, R., Clasper, S. and Banerji, S. (2001). LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends Immunol.* *22*, 317–321.

- Jadin, L., Wu, X., Ding, H., Frost, G.I., Onclinx, C., Triggs-Raine, B. and Flamion, B. (2008). Skeletal and hematological anomalies in HYAL2-deficient mice: a second type of mucopolysaccharidosis IX? *FASEB J.* 22, 4316–4326.
- Jeltsch, M., Kaipainen, A., Joukov, V., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H., Swartz, M., Fukumura, D., Jain, R.K. and Alitalo, K. (1997). Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276, 1423–1425.
- Jiang, D., Liang, J., Fan, J., Yu, S., Chen, S., Luo, Y., Prestwich, G.D., Mascarenhas, M.M., Garg, H.G., Quinn, D.A., Homer, R.J., Goldstein, D.R., Bucala, R., Lee, P.J., Medzhitov, R. and Noble, P.W. (2005). Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat. Med.* 11, 1173–1179.
- Johnson, G.B., Brunn, G.J., Kodaira, Y. and Platt, J.L. (2002). Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 168, 5233–5239.
- Johnson, L.A. and Jackson, D.G. (2010). Inflammation-induced secretion of CCL21 in lymphatic endothelium is a key regulator of integrin-mediated dendritic cell transmigration. *Int. Immunol.* 22, 839–849.
- Johnson, L.A., Prevo, R., Clasper, S. and Jackson, D.G. (2007). Inflammation-induced uptake and degradation of the lymphatic endothelial hyaluronan receptor LYVE-1. *J. Biol. Chem.* 282, 33671–33680.
- Joukov, V., Sorsa, T., Kumar, V., Jeltsch, M., Claesson-Welsh, L., Cao, Y., Saksela, O., Kalkkinen, N. and Alitalo, K. (1997). Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J.* 16, 3898–3911.
- Kaindl, T., Rieger, H., Kaschel, L.-M., Engel, U., Schmaus, A., Sleeman, J. and Tanaka, M. (2012). Spatio-Temporal Patterns of Pancreatic Cancer Cells Expressing CD44 Isoforms on Supported Membranes Displaying Hyaluronic Acid Oligomers Arrays. *PLoS ONE* 7, e42991.
- Kaneiwa, T., Mizumoto, S., Sugahara, K. and Yamada, S. (2010). Identification of human hyaluronidase-4 as a novel chondroitin sulfate hydrolase that preferentially cleaves the galactosaminidic linkage in the trisulfated tetrasaccharide sequence. *Glycobiology* 20, 300–309.
- Karkkainen, M.J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J., Taipale, J., Petrova, T.V., Jeltsch, M., Jackson, D.G., Talikka, M., Rauvala, H., Betsholtz, C. and Alitalo, K. (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.* 5, 74–80.
- Karkkainen, M.J., Saaristo, A., Jussila, L., Karila, K.A., Lawrence, E.C., Pajusola, K., Bueler, H., Eichmann, A., Kauppinen, R., Kettunen, M.I., Ylä-Herttuala, S., Finegold, D.N., Ferrell, R.E. and Alitalo, K. (2001). A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12677–12682.
- Karpanen, T., Egeblad, M., Karkkainen, M.J., Kubo, H., Ylä-Herttuala, S., Jäättelä, M. and Alitalo, K. (2001). Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res.* 61, 1786–1790.

- Kataru, R.P., Jung, K., Jang, C., Yang, H., Schwendener, R.A., Baik, J.E., Han, S.H., Alitalo, K. and Koh, G.Y. (2009). Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. *Blood* *113*, 5650–5659.
- Kerjaschki, D., Bago-Horvath, Z., Rudas, M., Sexl, V., Schneckenleithner, C., Wolbank, S., Bartel, G., Krieger, S., Kalt, R., Hantusch, B., Keller, T., Nagy-Bojarszky, K., Huttary, N., Raab, I., Lackner, K., Krautgasser, K., Schachner, H., Kaserer, K., Rezar, S., Madlener, S., Vonach, C., Davidovits, A., Nosaka, H., Hämmerle, M., Viola, K., Dolznig, H., Schreiber, M., Nader, A., Mikulits, W., Gnant, M., Hirakawa, S., Detmar, M., Alitalo, K., Nijman, S., Ottner, F., Maier, T.J., Steinhilber, D. and Krupitzka, G. (2011). Lipoxygenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mammary carcinoma xenografts in mouse. *J. Clin. Invest.* *121*, 2000–2012.
- Kinoshita, J., Kitamura, K., Kabashima, A., Saeki, H., Tanaka, S. and Sugimachi, K. (2001). Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *66*, 159–164.
- Kohda, D., Morton, C.J., Parkar, A.A., Hatanaka, H., Inagaki, F.M., Campbell, I.D. and Day, A.J. (1996). Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration. *Cell* *86*, 767–775.
- Kosaki, R., Watanabe, K. and Yamaguchi, Y. (1999). Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res.* *59*, 1141–1145.
- Kotimaa, A.A., Zainana, A.-M., Pulkkinen, E., Huusko, J., Heinonen, S.E., Kholová, I., Stedt, H., Lesch, H.P. and Ylä-Herttuala, S. (2012). Endothelium-specific over expression of human VEGF-D in mice leads to increased tumor frequency and a reduced lifespan. *The Journal of Gene Medicine*.
- Koyama, H., Hibi, T., Isogai, Z., Yoneda, M., Fujimori, M., Amano, J., Kawakubo, M., Kannagi, R., Kimata, K., Taniguchi, S. and Itano, N. (2007). Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M. *Am. J. Pathol.* *170*, 1086–1099.
- Krishnan, J., Kirkin, V., Steffen, A., Hegen, M., Weih, D., Tomarev, S., Wilting, J. and Sleeman, J.P. (2003). Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res.* *63*, 713–722.
- Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R.B. and Koul, H.K. (2008). Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res.* *68*, 1777–1785.
- Kumar, S., West, D.C., Ponting, J.M. and Gattamaneni, H.R. (1989). Sera of children with renal tumours contain low-molecular-mass hyaluronic acid. *Int. J. Cancer* *44*, 445–448.
- Kyzas, P.A., Geleff, S., Batistatou, A., Agnantis, N.J. and Stefanou, D. (2005). Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Pathol.* *206*, 170–177.

- Lähteenvuo, M., Honkonen, K., Tervala, T., Tammela, T., Suominen, E., Lähteenvuo, J., Kholová, I., Alitalo, K., Ylä-Herttuala, S. and Saaristo, A. (2011). Growth factor therapy and autologous lymph node transfer in lymphedema. *Circulation* *123*, 613–620.
- Laurent, C., Johnson-Wells, G., Hellström, S., Engström-Laurent, A. and Wells, A.F. (1991). Localization of hyaluronan in various muscular tissues. A morphological study in the rat. *Cell Tissue Res.* *263*, 201–205.
- Laurent, T.C. and Fraser, J.R. (1992). Hyaluronan. *FASEB J.* *6*, 2397–2404.
- Laurent, T.C., Laurent, U.B. and Fraser, J.R. (1995). Functions of hyaluronan. *Ann. Rheum. Dis.* *54*, 429–432.
- Lee, A.S., Kim, D.H., Lee, J.E., Jung, Y.J., Kang, K.P., Lee, S., Park, S.K., Kwak, J.Y., Lee, S.Y., Lim, S.T., Sung, M.J., Yoon, S.R. and Kim, W. (2011). Erythropoietin induces lymph node lymphangiogenesis and lymph node tumor metastasis. *Cancer Res.* *71*, 4506–4517.
- Lee, S., Kang, J., Yoo, J., Ganesan, S.K., Cook, S.C., Aguilar, B., Ramu, S., Lee, J. and Hong, Y.-K. (2009). Prox1 physically and functionally interacts with COUP-TFII to specify lymphatic endothelial cell fate. *Blood* *113*, 1856–1859.
- Lepperdinger, G., Strobl, B. and Kreil, G. (1998). HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J. Biol. Chem.* *273*, 22466–22470.
- Levesque, M.C. and Haynes, B.F. (1997). Cytokine induction of the ability of human monocyte CD44 to bind hyaluronan is mediated primarily by TNF-alpha and is inhibited by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* *159*, 6184–6194.
- Liao, S., Liu, J., Lin, P., Shi, T., Jain, R.K. and Xu, L. (2011). TGF-beta blockade controls ascites by preventing abnormalization of lymphatic vessels in orthotopic human ovarian carcinoma models. *Clin. Cancer Res.* *17*, 1415–1424.
- Lin, J., Lalani, A.S., Harding, T.C., Gonzalez, M., Wu, W.-W., Luan, B., Tu, G.H., Koprivnikar, K., VanRoey, M.J., He, Y., Alitalo, K. and Jooss, K. (2005). Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res.* *65*, 6901–6909.
- Lin, W., Jiang, L., Chen, Y., She, F., Han, S., Zhu, J., Zhou, L., Tang, N., Wang, X. and Li, X. (2012). Vascular endothelial growth factor-D promotes growth, lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in gallbladder cancer. *Cancer Lett.* *314*, 127–136.
- Lokeshwar, V.B., Obek, C., Soloway, M.S. and Block, N.L. (1997). Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Res.* *57*, 773–777.
- Lokeshwar, V.B., Rubinowicz, D., Schroeder, G.L., Forgacs, E., Minna, J.D., Block, N.L., Nadji, M. and Lokeshwar, B.L. (2001). Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* *276*, 11922–11932.

- Lu, P., Weaver, V.M. and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* *196*, 395–406.
- Mandriota, S.J., Jussila, L., Jeltsch, M., Compagni, A., Baetens, D., Prevo, R., Banerji, S., Huarte, J., Montesano, R., Jackson, D.G., Orci, L., Alitalo, K., Christofori, G. and Pepper, M.S. (2001). Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.* *20*, 672–682.
- Margolis, R.U. and Margolis, R.K. (1994). Aggrecan-versican-neurocan family proteoglycans. *Meth. Enzymol.* *245*, 105–126.
- Martin, D.C., Atmuri, V., Hemming, R.J., Farley, J., Mort, J.S., Byers, S., Hombach-Klonisch, S., Csoka, A.B., Stern, R. and Triggs-Raine, B.L. (2008). A mouse model of human mucopolysaccharidosis IX exhibits osteoarthritis. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1904–1915.
- Maruyama, K., Ii, M., Cursiefen, C., Jackson, D.G., Keino, H., Tomita, M., Van Rooijen, N., Takenaka, H., D'Amore, P.A., Stein-Streilein, J., Losordo, D.W. and Streilein, J.W. (2005). Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J. Clin. Invest.* *115*, 2363–2372.
- Massagué, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* *134*, 215–230.
- Matou-Nasri, S., Gaffney, J., Kumar, S. and Slevin, M. (2009). Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and gamma-adducin. *Int. J. Oncol.* *35*, 761–773.
- McKee, C.M., Penno, M.B., Cowman, M., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Bao, C. and Noble, P.W. (1996). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J. Clin. Invest.* *98*, 2403–2413.
- McLaughlin, S.A., Wright, M.J., Morris, K.T., Giron, G.L., Sampson, M.R., Brockway, J.P., Hurley, K.E., Riedel, E.R. and Van Zee, K.J. (2008). Prevalence of lymphedema in women with breast cancer 5 years after sentinel lymph node biopsy or axillary dissection: objective measurements. *J. Clin. Oncol.* *26*, 5213–5219.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *1*, 135–145.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C.A., Jr (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394–397.
- Meyer, K. (1958). Chemical structure of hyaluronic acid. *Fed. Proc.* *17*, 1075–1077.
- Meyer, M.F., Kreil, G. and Aschauer, H. (1997). The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme. *FEBS Lett.* *413*, 385–388.
- Montesano, R., Kumar, S., Orci, L. and Pepper, M.S. (1996). Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro. *Lab. Invest.* *75*, 249–262.

Moseley, R., Waddington, R.J. and Embery, G. (1997). Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1362, 221–231.

Mouta Carreira, C., Nasser, S.M., di Tomaso, E., Padera, T.P., Boucher, Y., Tomarev, S.I. and Jain, R.K. (2001). LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res.* 61, 8079–8084.

Mukherjee, P., Winter, S.L. and Alexandrow, M.G. (2010). Cell cycle arrest by transforming growth factor beta1 near G1/S is mediated by acute abrogation of prereplication complex activation involving an Rb-MCM interaction. *Mol. Cell. Biol.* 30, 845–856.

Mummert, M.E., Mummert, D., Edelbaum, D., Hui, F., Matsue, H. and Takashima, A. (2002). Synthesis and surface expression of hyaluronan by dendritic cells and its potential role in antigen presentation. *J. Immunol.* 169, 4322–4331.

Muñoz, N.M., Upton, M., Rojas, A., Washington, M.K., Lin, L., Chytil, A., Sozmen, E.G., Madison, B.B., Pozzi, A., Moon, R.T., Moses, H.L. and Grady, W.M. (2006). Transforming growth factor beta receptor type II inactivation induces the malignant transformation of intestinal neoplasms initiated by Apc mutation. *Cancer Res.* 66, 9837–9844.

Myint, P., Deeble, D.J., Beaumont, P.C., Blake, S.M. and Phillips, G.O. (1987). The reactivity of various free radicals with hyaluronic acid: steady-state and pulse radiolysis studies. *Biochim. Biophys. Acta* 925, 194–202.

Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M. and Miyake, K. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 3, 667–672.

Nakao, S., Zandi, S., Hata, Y., Kawahara, S., Arita, R., Schering, A., Sun, D., Melhorn, M.I., Ito, Y., Lara-Castillo, N., Ishibashi, T. and Hafezi-Maghadam, A. (2011). Blood vessel endothelial VEGFR-2 delays lymphangiogenesis: an endogenous trapping mechanism links lymph- and angiogenesis. *Blood* 117, 1081–1090.

Naor, D., Wallach-Dayana, S.B., Zahalka, M.A. and Sionov, R.V. (2008). Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin. Cancer Biol.* 18, 260–267.

Nightingale, T.D., Frayne, M.E.F., Clasper, S., Banerji, S. and Jackson, D.G. (2009). A mechanism of sialylation functionally silences the hyaluronan receptor LYVE-1 in lymphatic endothelium. *J. Biol. Chem.* 284, 3935–3945.

Noirey, N., Staquet, M.-J., Gariazzo, M.-J., Serres, M., André, C., Schmitt, D. and Vincent, C. (2002). Relationship between expression of matrix metalloproteinases and migration of epidermal and in vitro generated Langerhans cells. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 383–389.

Norrmén, C., Ivanov, K.I., Cheng, J., Zangger, N., Delorenzi, M., Jaquet, M., Miura, N., Puolakkainen, P., Horsley, V., Hu, J., Augustin, H.G., Ylä-Herttuala, S., Alitalo, K. and Petrova, T.V. (2009). FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1. *J. Cell Biol.* 185, 439–457.

- Norrmén, C., Tammela, T., Petrova, T.V. and Alitalo, K. (2011). Biological basis of therapeutic lymphangiogenesis. *Circulation* *123*, 1335–1351.
- Ny, A., Autiero, M. and Carmeliet, P. (2006). Zebrafish and *Xenopus* tadpoles: small animal models to study angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* *312*, 684–693.
- Ny, A., Koch, M., Schneider, M., Neven, E., Tong, R.T., Maity, S., Fischer, C., Plaisance, S., Lambrechts, D., Héligon, C., Terclavers, S., Ciesiolka, M., Kälin, R., Man, W.Y., Senn, I., Wyns, S., Lupu, F., Brändli, A. Vleminickx, K., Collen, D., Dewerchin, M., Conway, E.M., Moons, L., Jain, R.K. and Carmeliet, P. (2005). A genetic *Xenopus laevis* tadpole model to study lymphangiogenesis. *Nat. Med.* *11*, 998–1004.
- Oka, M., Iwata, C., Suzuki, H.I., Kiyono, K., Morishita, Y., Watabe, T., Komuro, A., Kano, M.R. and Miyazono, K. (2008). Inhibition of endogenous TGF-beta signaling enhances lymphangiogenesis. *Blood* *111*, 4571–4579.
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E.S., Young, D.W., Ishizaka, S.T., Rose, J., Chow, J.C. and Strauss, J.F., 3rd (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* *276*, 10229–10233.
- Ozbek, S., Balasubramanian, P.G., Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R.P. and Adams, J.C. (2010). The evolution of extracellular matrix. *Mol. Biol. Cell* *21*, 4300–4305.
- Paavonen, K., Puolakkainen, P., Jussila, L., Jahkola, T. and Alitalo, K. (2000). Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am. J. Pathol.* *156*, 1499–1504.
- Padera, T.P., Kadambi, A., di Tomaso, E., Carreira, C.M., Brown, E.B., Boucher, Y., Choi, N.C., Mathisen, D., Wain, J., Mark, E.J., Munn, L. and Jain, R.K. (2002). Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* *296*, 1883–1886.
- Peach, R.J., Hollenbaugh, D., Stamenkovic, I. and Aruffo, A. (1993). Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J. Cell Biol.* *122*, 257–264.
- Perng, C.-K., Wang, Y.-J., Tsi, C.-H. and Ma, H. (2011). In vivo angiogenesis effect of porous collagen scaffold with hyaluronic acid oligosaccharides. *J. Surg. Res.* *168*, 9–15.
- Petritsch, C., Beug, H., Balmain, A. and Oft, M. (2000). TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes Dev.* *14*, 3093–3101.
- Plate, K.H., Breier, G. and Risau, W. (1994). Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol.* *4*, 207–218.
- Posey, J.T., Soloway, M.S., Ekici, S., Sofer, M., Civantos, F., Duncan, R.C. and Lokeshwar, V.B. (2003). Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) for prostate cancer. *Cancer Res.* *63*, 2638–2644.
- Prehm, P. (1984). Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem. J.* *220*, 597–600.

- Prevo, R., Banerji, S., Ferguson, D.J., Clasper, S. and Jackson, D.G. (2001). Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J. Biol. Chem.* *276*, 19420–19430.
- Rahmanian, M., Pertoft, H., Kanda, S., Christofferson, R., Claesson-Welsh, L. and Heldin, P. (1997). Hyaluronan oligosaccharides induce tube formation of a brain endothelial cell line in vitro. *Exp. Cell Res.* *237*, 223–230.
- Ristimäki, A., Narko, K., Enholm, B., Joukov, V. and Alitalo, K. (1998). Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J. Biol. Chem.* *273*, 8413–8418.
- Roberts, N., Kloos, B., Cassella, M., Podgrabinska, S., Persaud, K., Wu, Y., Pytowski, B. and Skobe, M. (2006). Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res.* *66*, 2650–2657.
- Rooney, P., Wang, M., Kumar, P. and Kumar, S. (1993). Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells. *J. Cell. Sci.* *105 (Pt 1)*, 213–218.
- Ruiz, P., Schwärzler, C. and Günthert, U. (1995). CD44 isoforms during differentiation and development. *Bioessays* *17*, 17–24.
- Saaristo, A., Tammela, T., Farkkilä, A., Kärkkäinen, M., Suominen, E., Yla-Herttuala, S. and Alitalo, K. (2006). Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. *Am. J. Pathol.* *169*, 1080–1087.
- Sattar, A., Rooney, P., Kumar, S., Pye, D., West, D.C., Scott, I. and Ledger, P. (1994). Application of angiogenic oligosaccharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin. *J. Invest. Dermatol.* *103*, 576–579.
- Schimanski, C.C., Schwald, S., Simiantonaki, N., Jayasinghe, C., Gönner, U., Wilsberg, V., Junginger, T., Berger, M.R., Galle, P.R. and Moehler, M. (2005). Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* *11*, 1743–1750.
- Schledzewski, K., Falkowski, M., Moldenhauer, G., Metharom, P., Kzhyshkowska, J., Ganss, R., Demory, A., Falkowska-Hansen, B., Kurzen, H., Ugurel, S., Geginat, G., Arnold, B. and Goerdt, S. (2006). Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *J. Pathol.* *209*, 67–77.
- Scott, J.E. (1989). Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. *Ciba Found. Symp.* *143*, 6–15; discussion 15–20, 281–285.
- Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U. and Bell, J.I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*, 12160–12164.

- Sedivy, R., Beck-Mannagetta, J., Haverkamp, C., Battistutti, W. and Hönigschnabl, S. (2003). Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J. Oral Pathol. Med.* *32*, 455–460.
- Seton-Rogers, S.E., Lu, Y., Hines, L.M., Koundinya, M., LaBaer, J., Muthuswamy, S.K. and Brugge, J.S. (2004). Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 1257–1262.
- Shao, X.J. and Xie, F.M. (2005). Influence of angiogenesis inhibitors, endostatin and PF-4, on lymphangiogenesis. *Lymphology* *38*, 1–8.
- Shi, Y. and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* *113*, 685–700.
- Shim, K.S., Kim, K.H., Han, W.S. and Park, E.B. (1999). Elevated serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection. *Cancer* *85*, 554–561.
- Shimoda, H. (2009). Immunohistochemical demonstration of Angiopoietin-2 in lymphatic vascular development. *Histochem. Cell Biol.* *131*, 231–238.
- Shinriki, S., Jono, H., Ueda, M., Ota, K., Ota, T., Sueyoshi, T., Oike, Y., Ibusuki, M., Hiraki, A., Nakayama, H., Shinohara, M. and Ando, Y. (2011). Interleukin-6 signalling regulates vascular endothelial growth factor-C synthesis and lymphangiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. *J. Pathol.* *225*, 142–150.
- Shrestha, B., Hashiguchi, T., Ito, T., Miura, N., Takenouchi, K., Oyama, Y., Kawahara, K.-I., Tancharoen, S., Ki-I, Y., Arimura, N., Yoshinaga, N., Noma, S., Shresta, C., Nitanda, T., Kitajima, S., Arimura, K., Sato, M., Sakamoto, T. and Marujama, I. (2010). B cell-derived vascular endothelial growth factor A promotes lymphangiogenesis and high endothelial venule expansion in lymph nodes. *J. Immunol.* *184*, 4819–4826.
- Simpson, M.A. (2006). Concurrent expression of hyaluronan biosynthetic and processing enzymes promotes growth and vascularization of prostate tumors in mice. *Am. J. Pathol.* *169*, 247–257.
- Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D.G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L., Alitalo, K., Claffey, K. and Detmar, M. (2001). Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.* *7*, 192–198.
- Sleeman, J., Rudy, W., Hofmann, M., Moll, J., Herrlich, P. and Ponta, H. (1996). Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J. Cell Biol.* *135*, 1139–1150.
- Sleeman, J., Schmid, A. and Thiele, W. (2009). Tumor lymphatics. *Semin. Cancer Biol.* *19*, 285–297.

- Sleeman, J. and Steeg, P.S. (2010). Cancer metastasis as a therapeutic target. *Eur. J. Cancer* 46, 1177–1180.
- Sleeman, J.P. and Thiele, W. (2009). Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Int. J. Cancer* 125, 2747–2756.
- Slevin, M., Krupinski, J., Kumar, S. and Gaffney, J. (1998). Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Lab. Invest.* 78, 987–1003.
- Slevin, M., Kumar, S. and Gaffney, J. (2002). Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J. Biol. Chem.* 277, 41046–41059.
- Schmaus, A., (2011). Regulation der Lymphangiogenese: Moleküle, Mechanismen und die Rolle in pathologischen Prozessen. Doktorarbeit am Karlsruher Institut für Technologie
- Smiley, S.T., King, J.A. and Hancock, W.W. (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 167, 2887–2894.
- Spicer, A.P. and McDonald, J.A. (1998). Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J. Biol. Chem.* 273, 1923–1932.
- Sporn, M.B. (1996). The war on cancer. *Lancet* 347, 1377–1381.
- Stacker, S.A., Caesar, C., Baldwin, M.E., Thornton, G.E., Williams, R.A., Prevo, R., Jackson, D.G., Nishikawa, S., Kubo, H. and Achen, M.G. (2001). VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat. Med.* 7, 186–191.
- Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J.M. and Seed, B. (1989). A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56, 1057–1062.
- Stanton, A.W.B., Modi, S., Mellor, R.H., Levick, J.R. and Mortimer, P.S. (2009). Recent advances in breast cancer-related lymphedema of the arm: lymphatic pump failure and predisposing factors. *Lymphat Res Biol* 7, 29–45.
- Stern, R. (2004). Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 317–325.
- Stern, R. and Jedrzejewski, M.J. (2006). Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem. Rev.* 106, 818–839.
- Su, J.-L., Shih, J.-Y., Yen, M.-L., Jeng, Y.-M., Chang, C.-C., Hsieh, C.-Y., Wei, L.-H., Yang, P.-C. and Kuo, M.-L. (2004). Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 64, 554–564.
- Su, J.-L., Yang, P.-C., Shih, J.-Y., Yang, C.-Y., Wei, L.-H., Hsieh, C.-Y., Chou, C.-H., Jeng, Y.-M., Wang, M.-Y., Chang, K.-J., Hung, C. and Kuo, M.L. (2006). The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* 9, 209–223.

- Suzuki, M., Kobayashi, H., Kanayama, N., Nishida, T., Takigawa, M. and Terao, T. (2002). CD44 stimulation by fragmented hyaluronic acid induces upregulation and tyrosine phosphorylation of c-Met receptor protein in human chondrosarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1591, 37–44.
- Suzuki, Y., Ito, Y., Mizuno, M., Kinashi, H., Sawai, A., Noda, Y., Mizuno, T., Shimizu, H., Fujita, Y., Matsui, K., Maruyama, S., Imai, E., Matsuo, S. and Takei, Y. (2012). Transforming growth factor- β induces vascular endothelial growth factor-C expression leading to lymphangiogenesis in rat unilateral ureteral obstruction. *Kidney International*.
- Takagaki, K., Nakamura, T., Izumi, J., Saitoh, H., Endo, M., Kojima, K., Kato, I. and Majima, M. (1994). Characterization of hydrolysis and transglycosylation by testicular hyaluronidase using ion-spray mass spectrometry. *Biochemistry* 33, 6503–6507.
- Tammela, T. and Alitalo, K. (2010). Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 140, 460–476.
- Tammela, T., Saaristo, A., Holopainen, T., Lyytikkä, J., Kotronen, A., Pitkonen, M., Abo-Ramadan, U., Ylä-Herttuala, S., Petrova, T.V. and Alitalo, K. (2007). Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat. Med.* 13, 1458–1466.
- Tammela, T., Saaristo, A., Holopainen, T., Ylä-Herttuala, S., Andersson, L.C., Virolainen, S., Immonen, I. and Alitalo, K. (2011). Photodynamic ablation of lymphatic vessels and intralymphatic cancer cells prevents metastasis. *Sci Transl Med* 3, 69ra11.
- Taylor, K.R., Trowbridge, J.M., Rudisill, J.A., Termeer, C.C., Simon, J.C. and Gallo, R.L. (2004). Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J. Biol. Chem.* 279, 17079–17084.
- Taylor, K.R., Yamasaki, K., Radek, K.A., Di Nardo, A., Goodarzi, H., Golenbock, D., Beutler, B. and Gallo, R.L. (2007). Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J. Biol. Chem.* 282, 18265–18275.
- Teder, P., Vandivier, R.W., Jiang, D., Liang, J., Cohn, L., Puré, E., Henson, P.M. and Noble, P.W. (2002). Resolution of lung inflammation by CD44. *Science* 296, 155–158.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. and Simon, J.C. (2002). Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 195, 99–111.
- Termeer, C.C., Hennies, J., Voith, U., Ahrens, T., Weiss, J.M., Prehm, P. and Simon, J.C. (2000). Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J. Immunol.* 165, 1863–1870.
- Thiele, W., Krishnan, J., Rothley, M., Weih, D., Plaumann, D., Kuch, V., Quagliata, L., Weich, H.A. and Sleeman, J.P. (2012). VEGFR-3 is expressed on megakaryocyte precursors in the murine bone marrow and plays a regulatory role in megakaryopoiesis. *Blood*.

- Thiele, W. and Sleeman, J.P. (2006). Tumor-induced lymphangiogenesis: a target for cancer therapy? *J. Biotechnol.* *124*, 224–241.
- Toole, B.P., Wight, T.N. and Tammi, M.I. (2002). Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J. Biol. Chem.* *277*, 4593–4596.
- Udabage, L., Brownlee, G.R., Nilsson, S.K. and Brown, T.J. (2005). The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp. Cell Res.* *310*, 205–217.
- Uhrin, P., Zaujec, J., Breuss, J.M., Olcaydu, D., Chrenek, P., Stockinger, H., Fuertbauer, E., Moser, M., Haiko, P., Fässler, R., Alitalo, K., Binder, B.R. and Kerjaschki, D. (2010). Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood* *115*, 3997–4005.
- Valastyan, S. and Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* *147*, 275–292.
- Voelcker, V., Gebhardt, C., Averbeck, M., Saalbach, A., Wolf, V., Weih, F., Sleeman, J., Anderegg, U. and Simon, J. (2008). Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4. *Exp. Dermatol.* *17*, 100–107.
- Wang, Y.Z., Cao, M.L., Liu, Y.W., He, Y.Q., Yang, C.X. and Gao, F. (2011). CD44 mediates oligosaccharides of hyaluronan-induced proliferation, tube formation and signal transduction in endothelial cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* *236*, 84–90.
- West, D.C., Hampson, I.N., Arnold, F. and Kumar, S. (1985). Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* *228*, 1324–1326.
- West, D.C. and Kumar, S. (1989). The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp. Cell Res.* *183*, 179–196.
- Wigle, J.T., Harvey, N., Detmar, M., Lagutina, I., Grosveld, G., Gunn, M.D., Jackson, D.G. and Oliver, G. (2002). An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* *21*, 1505–1513.
- Wigle, J.T. and Oliver, G. (1999). Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* *98*, 769–778.
- Wiley, H.E., Gonzalez, E.B., Maki, W., Wu, M.T. and Hwang, S.T. (2001). Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 1638–1643.
- Wolny, P.M., Banerji, S., Gounou, C., Brisson, A.R., Day, A.J., Jackson, D.G. and Richter, R.P. (2010). Analysis of CD44-hyaluronan interactions in an artificial membrane system: insights into the distinct binding properties of high and low molecular weight hyaluronan. *J. Biol. Chem.* *285*, 30170–30180.
- Xie, W., Mertens, J.C., Reiss, D.J., Rimm, D.L., Camp, R.L., Haffty, B.G. and Reiss, M. (2002). Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study. *Cancer Res.* *62*, 497–505.

- Xu, H., Ito, T., Tawada, A., Maeda, H., Yamanokuchi, H., Isahara, K., Yoshida, K., Uchiyama, Y. and Asari, A. (2002). Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J. Biol. Chem.* *277*, 17308–17314.
- Xu, Y., Yuan, L., Mak, J., Pardanaud, L., Caunt, M., Kasman, I., Larrivée, B., Del Toro, R., Suchting, S., Medvinsky, A., Silva, J., Yang, J., Thomas, J.L., Koch, A.W., Alitalo, K., Eichmann, A. and Bagri, A. (2010). Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J. Cell Biol.* *188*, 115–130.
- Yamazaki, T., Yoshimatsu, Y., Morishita, Y., Miyazono, K. and Watabe, T. (2009). COUP-TFII regulates the functions of Prox1 in lymphatic endothelial cells through direct interaction. *Genes Cells* *14*, 425–434.
- Yan, Z.-X., Jiang, Z.-H. and Liu, N.-F. (2012). Angiopoietin-2 promotes inflammatory lymphangiogenesis and its effect can be blocked by the specific inhibitor L1-10. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *302*, H215–223.
- Yanagawa, T., Shinozaki, T., Watanabe, H., Saito, K., Raz, A. and Takagishi, K. (2012). Vascular endothelial growth factor-D is a key molecule that enhances lymphatic metastasis of soft tissue sarcomas. *Experimental Cell Research*.
- Yao, J.S., Zhai, W., Young, W.L. and Yang, G.-Y. (2006). Interleukin-6 triggers human cerebral endothelial cells proliferation and migration: the role for KDR and MMP-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *342*, 1396–1404.
- Yiannakopoulou, E. (2011). Modulation of Lymphangiogenesis: A New Target for Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-inflammatory Agents? A Systematic Review. *Journal of Clinical Pharmacology*.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M. and Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* *67*, 10123–10128.
- Zhu, G.G., Risteli, L., Mäkinen, M., Risteli, J., Kauppila, A. and Stenbäck, F. (1995). Immunohistochemical study of type I collagen and type I pN-collagen in benign and malignant ovarian neoplasms. *Cancer* *75*, 1010–1017.
- Zhuo, W., Luo, C., Wang, X., Song, X., Fu, Y. and Luo, Y. (2010). Endostatin inhibits tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis via cell surface nucleolin on lymphangiogenic endothelial cells. *J. Pathol.* *222*, 249–260.
- Zöller, M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* *11*, 254–267.
- Zumsteg, A., Baeriswyl, V., Imaizumi, N., Schwendener, R., Rüegg, C. and Christofori, G. (2009). Myeloid cells contribute to tumor lymphangiogenesis. *PLoS ONE* *4*, e7067.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Größenbestimmung von Hyaluronsäurefragmenten mittels FACE-Analyse.
- Abbildung 2:** Hyaluronsäurefragmente vermitteln einen größen- und konzentrationsabhängigen biphasischen Effekt auf die Proliferation von primären humanen LECs.
- Abbildung 3:** Hohe sHA-Konzentrationen hemmen die Migration von LECs *in vitro*
- Abbildung 4:** sHA-Moleküle vermitteln einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt auf die Bildung gefäßartiger Strukturen durch LECs *in vitro*.
- Abbildung 5:** Hohe sHA-Konzentrationen induzieren einen G1-Arrest in LECs *in vitro*.
- Abbildung 6:** sHA vermittelt zusammen mit VEGF-C und FGF-2 einen additiven Effekt auf die Proliferation von primären humanen LECs.
- Abbildung 7:** CD44, TLR-4 und LYVE-1 sind auf der Oberfläche humaner LECs exprimiert.
- Abbildung 8:** LYVE-1 vermittelt den pro-proliferativen Effekt niedriger sHA-Konzentrationen.
- Abbildung 9:** Das Gros der LYVE-1-Moleküle auf der Oberfläche von LECs ist sialisiert.
- Abbildung 10:** PDGF β R und PDGF α R werden weder auf Proteinebene noch auf RNA-Ebene in LECs exprimiert.
- Abbildung 11:** IL-6 besitzt keinen Einfluss auf die pro-proliferative Wirkung von sHA.
- Abbildung 12A:** Untersuchung der Regulierung von Signalmolekülen in LECs nach einer Behandlung mit sHA.
- Abbildung 12B:** sHA induziert keine Translokation von NF- κ B in den Nukleus von LECs.
- Abbildung 13:** TGF- β inhibiert die Proliferation von LECs *in vitro* und vermittelt den anti-proliferativen Effekt hoher sHA-Konzentrationen.
- Abbildung 14A:** TGF- β -1, -2 und -3 besitzen einen Einfluss auf die Expression von Prox-1 und LYVE-1 in primären humanen LECs

- Abbildung 14B** Die Behandlung von LECs mit TGF- β -2 führt zu einer Herunterregulierung von VEGFR-3
- Abbildung 14C:** TGF- β -1, -2 und -3 besitzen einen nur schwachen Effekt auf die Morphologie von LECs
- Abbildung 15A:** Hohe sHA-Konzentrationen induzieren einen morphologischen Wandel von LECs.
- Abbildung 15B:** sHA induziert in hohen Konzentrationen eine Herunterregulierung des lymphatischen Markers Prox-1.
- Abbildung 15C/D:** Hohe sHA-Konzentrationen induzieren LYVE-1- und TGF- β -unabhängig die Herunterregulierung der lymphatischen Marker VEGFR-3, Prox-1 und LYVE-1.
- Abbildung 16:** LYVE-1 besitzt eine Rolle in der lokalen Lymphknotenmetastasierung.

Abkürzungsverzeichnis

ANDS	7-Amino-1,3-naphtalendisulfonsäure
Ang-2	Angiopoietin-2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF-2	Activating transcription factor-2
BECs	Blood endothelial cells
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
BTH	Bovine Testis Hyaluronidase
CAM-Assay	Chorio-Allantois-Membran Assay
CCBE-1	Collagen and Calcium-Binding EGF Domain-Containing Protein-1
CCL-2	Chemokine (C-C-Motif) Ligand-2
CCL-21	Chemokine (C-C-Motif) Ligand-21
CCR-2	Chemokine (C-C-Motif) Receptor-2
CCR-7	Chemokine (C-C-Motif) Receptor-7
CLEC-2	C-type Lectin Domain family-2
COUP-TF II	COUP transcription factor 2
COX-2	Cyclooxygenase-2
cRGD	Zyklisches Peptid aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure
CRSBP-1	Cell Surface Retention Sequence Binding Protein-1
CTCs	Circulating Tumor Cells
Ds	Disaccharide
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epitheliale/Endotheliale-Mesenchymale Transition
EPO	Erythropoietin
EREG	Epiregulin
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACE	Fluorophor Assisted Carbohydrate Electrophoresis
FCS	Fetal Calf Serum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
Foxc2	Forkhead box protein 2
GH	Growth Hormone

GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HEV	High Endothelial Venules
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HMW-HA	High Molecular Weight Hyaluronic Acid
HoxD8	Homeobox Protein D8
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1
HRP	Horseradish peroxidase
HUVECs	Human Vascular Endothelial Cells
Hyal	Hyaluronidase
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IGF-1/-2	Insulin-like Growth Factor-1/-2
IL-11	Interleukin-11
IL-17	Interleukin-17
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IP	Immunpräzipitation
JNK1/3	c-Jun N-terminal Kinasen 1/3
kDA	Kilodalton
LECs	Lymphatic Endothelial Cells
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LRA	Lymphatic Ring Assay
LYVE-1	Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronic Acid Receptor-1
MAA	<i>Maackia Amurensis</i>
MCF-7	Michigan Cancer Foundation -7
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MSCs	Mesenchymal Stroma Cells
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NFATc1	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

Nrp-2	Neuropillin-2
PCs	Pericytes
PDGF-BB	Platelet-Derived Growth Factor-BB
PDGF α/β R	Platelet-Derived Growth Factor Receptor α/β
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prox-1	Prospero Homeobox Protein-1
PVA	Polyvenylalkohol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RHAMM	Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
sHA	Small molecular weight Hyaluronic Acid
SLP-76	Src homology 2 (SH2) domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
SMCs	Smooth Muscle Cells
Sox-18	SRY-related HMG-box protein-18
Src	Cellular und sarcoma
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TIF	Tumor-interstitielle Flüssigkeit
TLR-2	Toll-Like Receptor-2
TLR-4	Toll-Like Receptor-4
TNF- α/β	Tumor Nekrose Faktor- α/β
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor-A
VEGF-C	Vascular Endothelial Growth Factor-C
VEGF-D	Vascular Endothelial Growth Factor-D
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
VEGFR-3	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jonathan Sleeman bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte, diese Arbeit in seinem Labor anzufertigen. Vielen Dank für die sehr gute Betreuung.

Frau Prof. Dr. Ilse Hofmann danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Frau PD Dr. Veronique Orian-Rosseau und Herrn Prof. Dr. Andy Cato möchte ich für die aktive Mitgliedschaft im TAC-Komitee und ihre kritischen und hilfreichen Anregungen danken.

Danken möchte ich all meinen Laborkollegen, die mir in vielen wissenschaftlichen Diskussionen neue Inspirationen gaben und mir mit Ratschlägen stets eine große Hilfe waren. Mein besonderer Dank geht dabei an Dr. Wilko Thiele, Dr. Melanie Rothley, Dr. Anja Schmaus, Alexandra Baumann, Diana Plaumann-Ziegler, Sandra Klusmeier und Bettina Göppert. Erst durch diese produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit war es möglich, diese Arbeit in diesem Umfang anzufertigen.

Großartige Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche bekam ich von Selma Huber und Hella Zabanski, dafür meinen herzlichen Dank.

Mein spezieller Dank geht an meine Familie, die mich in all der Zeit stets unterstützte und mir ein großer Rückhalt war. Vielen lieben Dank an meine Eltern, meine Verlobte Tabea, meine Schwester Nadine, mein Patenkind Jakob und Isolde.