

Aus dem anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Ralph Lucius)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**BIOLOGISCHE EFFEKTE SYNTHETISCHER LIGANDEN AUF CXCR4- UND CXCR7-
EXPRIMIERENDE TUMORZELLEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
SCHRÖTER, ALINA
Aus **Schwedt/Oder**
Kiel **2017**

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Kirsten Hattermann-Koch

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Friederike Egberts

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 12.12.2017

gez.: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Martia Böttner

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren	1
1.1.1 Struktur und Nomenklatur von Chemokinen.....	1
1.1.2 Funktion von Chemokinen.....	2
1.1.3 Struktur und Nomenklatur von Chemokinrezeptoren	3
1.1.4 Funktion und Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren	4
1.2 Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7	5
1.3 CXCR4/CXCR7 Interaktion und Internalisierung	6
1.4 Chemokine CXCL11/I-TAC und CXCL12/SDF-1	6
1.5 Chemokine in Tumoren.....	7
1.6 Visualisierung von Tumoren in vivo über Chemokinrezeptoren	9
1.7 Synthetische CXCR4- und CXCR7-Liganden.....	9
2 Fragestellung.....	13
3 Materialien und Methoden	14
3.1 Materialien	14
3.1.1 Geräte	14
3.1.2 Chemikalien	14
3.1.3 Puffer.....	15
3.1.4 Verbrauchsmaterialien	15
3.1.5 Stimulantien und Inhibitoren.....	15
3.1.6 Antikörper.....	15
3.1.7 Fertigsystem (“Kit”).....	16
3.1.8 Enzyme	16
3.1.9 TaqMan® Primer Probes.....	16
3.1.10 Zellkulturmedien.....	17
3.1.11 Zelllinien.....	17
3.2 Methoden.....	17
3.2.1 Zellkulturarbeiten.....	17
3.2.1.1 Allgemein.....	17
3.2.1.2 Anzucht der Zellen.....	17
3.2.1.3 Mediumwechsel.....	18
3.2.1.4 Subkultivierung der Zellen	18
3.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl	19
3.2.1.6 Einfrieren und Lagerung der Zellen	19
3.2.1.7 Auftauen von eingefrorenen Zellen.....	19

3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	20
3.2.2.1	RNA- Isolierung	20
3.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	20
3.2.2.3	DNase-Verdau und Aufreinigung der isolierten RNA	21
3.2.2.4	cDNA-Synthese	21
3.2.2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR), rt-PCR	22
3.2.3	Morphologisch-optische Methoden	24
3.2.3.1	Native immunzytochemische Färbung.....	24
3.2.3.2	Quantifizierung der Internalisierung	26
3.2.3.3	Ermittlung der Apoptoserate	26
3.3	Statistik	27
4	Ergebnisse.....	28
4.1	Expression von mRNA.....	28
4.2	Internalisierungsnachweise	30
4.2.1	Expression der Proteine	30
4.2.2	Vorversuche zur Lebendfärbung und Internalisierungszeiten.....	30
4.2.3	Internalisierung von CXCR4 und CXCR7	31
4.2.4	Quantifizierung der Internalisierung bei SK-NSH	37
4.2.5	Quantifizierung der Internalisierung bei MCF-7	38
4.3	Untersuchungen der Apoptoserate	40
5	Diskussion	43
5.1	Internalisierung der synthetischen Liganden	43
5.2	Einsatz der Liganden in der therapeutischen Diagnostik	44
5.3	Einsatz synthetischer Liganden in der Krebsdiagnostik und -therapie.....	47
6	Zusammenfassung	52
7	Quellenverzeichnis	53
	Danksagung.....	58
	Lebenslauf	59

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen, Einheiten sowie Zeit- und Maßangaben sind nicht aufgeführt:

α	erster Buchstabe des gr. Alphabets <i>alpha</i> , Bedeutung hier oft <i>anti</i>
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CXCR4/7	CXC-Chemokinrezeptor 4/7
C _t	Schwellenwert-Zyklus: <i>cycle threshold</i>
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor: <i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EZR	Extrazellulärraum
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GTP/GDP	Guanosintri-/diphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Phosphatidylinositol-1,4,5-Trisphosphat
I-TAC	= CXCL11: <i>interferon-inducible T-cell α chemoattractant</i>
IZR	Intrazellulärraum
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung: <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion: <i>polymerase chain reaction</i>
PDL	Poly-D-Lysin
PTX	Toxin aus <i>Bordetella pertussis</i>
SDF-1	= CXCL12: <i>stromal cell-derived factor 1</i>
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Einbuchstabencodes für Aminosäuren:

A Alanin	G Glycin	M Methionin	S Serin
C Cystein	H Histidin	N Asparagin	T Threonin
D Asparaginsäure	I Isoleucin	P Prolin	V Valin
E Glutaminsäure	K Lysin	Q Glutamin	W Tryptophan
F Phenylalanin	L Leucin	R Arginin	Y Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemokine in der Tumorbiologie

Abbildung 2: Strukturformel von Phe5-AcTZ

Abbildung 3: Strukturformel von FC 131

Abbildung 4: Strukturformel von Ga-CPCR4-2

Abbildung 5: Basis-Strukturformel von HexGua

Abbildung 6: Nachweis von Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7

Abbildung 7: Nachweis der Liganden

Abbildung 8: Internalisierung natürlicher Liganden im Vergleich zu ruhenden bzw. nicht stimulierten Zellen an SK-NSH-Zellen

Abbildung 9: Internalisierung natürlicher Liganden im Vergleich zu ruhenden bzw. nicht stimulierten Zellen an MCF-7-Zellen

Abbildung 10: Internalisierung synthetischer Liganden an SK-NSH- Zellen

Abbildung 11: Internalisierung synthetischer Liganden an MCF-7-Zellen

Abbildung 12: Quantifizierung der Internalisierung der SK-NSH-Zellen und graphische Darstellung der relativen Werte

Abbildung 13: Quantifizierung der Internalisierung der MCF-7-Zellen mit graphischer Auswertung der Ergebnisse

Abbildung 14: Apoptoserate der SK-NSH-Zellen

Abbildung 15: Apoptoserate der MCF-7-Zellen

Abbildung 16: Röntgenbild des Zahnes 37 bei chronischer Parodontitis als Einsatzgebiet der photodynamischen Therapie

Abbildung 17: Positronenemissionstomographische Darstellung von OH1-Tumor-positiven Mäusen mittels Ga-CPCR4-2

Abbildung 18: Möglicher Einsatzzeitpunkt radiologisch detektierbarer Liganden in der Chemotherapie zur Abschätzung der restlichen Tumormasse

1 Einleitung

Bei Frauen ist das Mammakarzinom die mit ca. 70000 Fällen im Jahr 2011 häufigste Krebsneuerkrankung in Deutschland [Robert Koch-Institut, 2015]. Gemäß den Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts von 2011 ist trotz eines Anstiegs der Neuerkrankungen in den letzten 15 Jahren um ca. 20 %, was unter anderem auch auf eine flächendeckendere Diagnostik zurückzuführen ist, die Zahl der Sterbefälle mit 24/100000 Frauen konstant geblieben. Die mit 87 % recht hohe 5-Jahres-Überlebensrate ist unter anderem durch verbesserte und evidenzbasierte Therapiemethoden zu begründen. Problematisch in der Therapie ist häufig jedoch nicht der primäre Tumor, sondern auftretende Metastasen in Knochen, Lymphknoten und Gehirn. Eine späte Diagnose zieht somit auch häufig einen schweren Verlauf nach sich.

Die Metastasierung, als wichtigstes Merkmal für maligne Tumoren, gilt als der Hauptgrund für das frühzeitige Versterben von Patienten, bei denen eine Krebserkrankung diagnostiziert wird. Folglich ist eine umfangreiche und zuverlässige Früherkennung des Potenzials des Primärtumors insbesondere in Bezug auf Metastasierung und Invasivität der wichtigste Punkt, um dementsprechend Therapiestrategie und somit Prognose beeinflussen zu können. Schon seit längerem ist bekannt, dass die komplexe Kaskade der Metastasierung, bestehend aus einzeln ablaufenden zellulären Programmen, maßgeblich durch Chemokine und ihre Chemokinrezeptoren beeinflusst wird [Müller et al., 2001].

1.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren

1.1.1 Struktur und Nomenklatur von Chemokinen

Chemokine sind kleine, durch Zellen sezernierte Signalproteine, die als Liganden für Chemokinrezeptoren fungieren. Diese basischen, chemotaktisch aktiven Proteine bestehen aus circa 75-125 Aminosäuren und weisen eine Molmasse von 8-14 kDa auf. Ihr Name leitet sich von „chemoattractant cytokines“ ab, was ihre Zugehörigkeit und anfängliche Einordnung zu den Zytokinen deutlich macht. Mittlerweile werden Chemokine als eigene Gruppe eingeordnet. Exprimiert werden sie von Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen, Epithelzellen, Stromazellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Chondrozyten, Keratinozyten und T-Zellen [Baggiolini et al., 1998]. Ein Chemokin besteht aus einem drei-strängigen antiparallelen β -Faltblatt und einem N-terminalen beziehungsweise C-terminalen Ende. Am Carboxy-Terminus endet die Kette mit einer α -Helix.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist das Vorhandensein von zwei bis vier Cysteinresten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Beim Menschen sind ca. 50 verschiedene Chemokine bekannt, deren Einteilung anhand der Anzahl und des Abstandes der konservierten Cysteinreste in der N-terminalen Region in vier Untergruppen erfolgt:

1. CXC-Unterfamilie (α -Chemokine)
 - Eine Aminosäure trennt die beiden Cysteinresten.
2. CC-Unterfamilie (β -Chemokine)
 - Die Cysteinreste sind direkt benachbart.
3. C-Unterfamilie (γ -Chemokine)
 - Es befindet sich bei den zwei Vertretern dieser Gruppe (XCL1 und XCL2) nur ein konservierter Cysteinrest am N-Terminus.
4. CX3C-Unterfamilie (δ -Chemokine)
 - Drei Aminosäuren liegen zwischen den Cysteinresten. Bisher gibt es nur einen bekannten Vertreter dieser Untergruppe, das Fraktalkin (CX3CL1).

Bedingt durch ihre Funktion und aufgrund des Expressionsmusters ist außerdem eine weitere Einteilung in homöostatische, inflammatorische und inflammatorisch-homeostatische Chemokine [Moser et al., 2004] möglich. Die größere Gruppe bilden die inflammatorischen Chemokine, deren Produktion durch proinflammatorische Stimuli ausgelöst wird. Ihre Ausschüttung lockt daraufhin Immunzellen zum Ort des Entzündungsgeschehens. Homöostatische Chemokine hingegen werden konstitutiv von bestimmten Zellen und Geweben exprimiert. Sie koordinieren die Migration der Immunzellen und spielen eine wichtige Rolle bei der immunologischen Überwachung. Die generelle Synthese der Chemokine erfolgt in Form eines Prä-Pro-Peptids, wobei die Prä-Pro-Sequenz bestehend aus ca. 20 Aminosäuren abgespalten, somit das aktive Chemokin gebildet und dann sezerniert wird.

1.1.2 Funktion von Chemokinen

Die Hauptfunktion von Chemokinen und ihren entsprechenden Rezeptoren besteht in der Auslösung der Chemotaxis bei Immunzellen, das heißt, die Einwanderung der Zellen wird durch Chemokin-Gradienten im Gewebe gelenkt. Weiterhin greifen sie direkt in Adhäsionsvorgänge am Endothel ein und fördern die transendotheliale Migration von Leukozyten (Haptotaxis), sowie deren Proliferation, Apoptose/Anti-Apoptose und

Genexpression. Chemokine spielen eine Schlüsselrolle bei der Immunabwehr [Zlotnik, Yoshie, 2000]. Chemokine, wie zum Beispiel CXCL12, spielen außerdem eine wichtige Rolle für die Embryogenese, Organogenese, Hämatopoese und auch Pathogenese [Nagasawa, 2014]. Vor allem bei Tumoren beeinflussen sie das Wachstum des Primärtumors, die Angiogenese, Metastasierung und das Wachstum/Überleben der metastasierten Zellen [O'Hayre et al. 2008, Raman, 2007, Zlotnik, 2006].

1.1.3 Struktur und Nomenklatur von Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte, sieben transmembrane Domänen umfassende Rezeptoren. Das heißt, sie bestehen aus sieben α -helikalen, die Membran durchspannende Regionen, die durch jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen außerhalb bzw. innerhalb der Membran verbunden sind. Sie kommen sowohl auf der Oberfläche von Zellen als auch intrazellulär in Vesikeln vor. Die bis heute ungefähr 20 bekannten humanen Chemokinrezeptoren signalisieren durch heterotrimere G-Proteine und können infolge ihrer Funktion den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren (Klasse A/1) zugeordnet werden. Sie haben eine Länge von 340-370 Aminosäuren, ein basierend auf der Aminosäuresequenz geschätztes Molekulargewicht von ca. 40 kDa und weisen einen aziden, extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus auf. Ihr tatsächliches Gewicht ist aufgrund der vorhandenen Glykosylierungen oft höher. Disulfidbrücken zwischen konservierten, extrazellulären Cysteinresten in der ersten und zweiten Schleife stabilisieren die Tertiärstruktur. Im C-Terminus finden sich Serin- und Threoninreste, die phosphoryliert werden können und somit der Regulation des Rezeptors dienen [Allen et al., 2007]. Für die Ligandenbindung ist der extrazelluläre N-Terminus verantwortlich. Teile des C-Terminus und der intrazellulären Schleifen vermitteln die Ankopplung an G-Proteine und andere Moleküle der Signaltransduktion. Spezifisch ist außerdem das Vorliegen eines DRY-Motivs (Asp-Arg-Tyr) auf der zytoplasmatischen Seite der dritten Transmembrandomäne in fast allen Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, welches für die Kopplung der inhibitorischen $G\alpha$ -Untereinheit an den Rezeptor wichtig ist. Atypische Chemokinrezeptoren besitzen kein oder ein verändertes DRYLAIV-Motiv. Dadurch sind sie nicht dazu in der Lage, typische Signalwege nach Ligandenbindung in Gang zu setzen. Sie können jedoch Chemokine binden, internalisieren und somit die extrazelluläre Chemokinkonzentration regulieren. Man bezeichnet sie als „Decoy“- , „Scavenger“- oder stille Rezeptoren. Obwohl die meisten Chemokinrezeptoren mehrere Chemokine binden können, beschränken sich die Bindungspartner eines Rezeptors meist auf Mitglieder einer

Chemokinunterfamilie. Die Nomenklatur erfolgt demnach in Abhängigkeit der Unterfamilienzugehörigkeit ihrer Liganden [Murphy et al., 2000]. Der Name setzt sich hierbei aus der Bezeichnung der Chemokinfamilie (CXC-, CC-, XC- oder CX3C-Motiv), einem R für Rezeptor und einer fortlaufenden Nummerierung zusammen. Für einige Chemokinrezeptoren, wie z.B. CXCR4, sind auch G-Protein unabhängige Signalwege bekannt [Luttrell, Lefkowitz, 2002].

1.1.4 Funktion und Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren

Die Hauptfunktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) besteht in der Weiterleitung von Signalen ins Zellinnere durch heterotrimere G-Proteine. Die meisten der eingeleiteten Signalwege sind abhängig von der Kopplung an ein inhibitorisches $G\alpha$ -Protein. In Abwesenheit des Chemokins liegen diese im inaktiven Guanosindiphosphat (GDP)-bindenden Zustand vor. Die Interaktion des Chemokins mit seinem Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung und somit Aktivierung des Rezeptors, wodurch intrazellulär der Austausch von GDP zu GTP an der inhibitorischen $G\alpha$ -Untereinheit vermittelt wird. $G\alpha$ -GTP löst sich daraufhin vom Rezeptor und dissoziiert von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit. Beide Untereinheiten können folgend zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden führen. Bei den meisten inhibitorischen G-Proteinen kommt es beispielsweise zu einer Inhibition von Adenylatcyclasen und Aktivierung von Src Tyrosinkinasen. Die $G\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert die membranständige Phospholipase C, die Phosphatidylinositol-Biphosphat (PIP₂) in die „Second messenger“ Inositol-Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP₃ vermittelt die Freisetzung von Calcium (Ca^{2+}). DAG und Calcium aktivieren anschließend die Proteinkinase C. Die rezeptor-aktivierten Kinasen können zur C-terminalen Phosphorylierung des Chemokinrezeptors führen. Die Phosphorylierung leitet damit die Termination der Rezeptor-Aktivität ein [Oppermann et al., 1999]. Im Anschluss an die Phosphorylierung des Rezeptors kommt es zu einer Bindung von β -Arrestin, das direkt die Rezeptoraktivität unterbindet, indem es in die Wechselwirkung von Rezeptor und heterotrimerem G-Protein eingreift. Die β -Arrestin-abhängige Signaltransduktion führt zur Aktivierung verschiedener Kinasen, wie zum Beispiel die Src-Kinase, die wiederum die MAPK-Kaskade initiiert [Luttrell, Miller, 2013]. Dieser Weg läuft jedoch langsamer ab, als der G-Protein-gekoppelte.

1.2 Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7

Sowohl CXCR4, als auch CXCR7 sind in Transmigrations-, Invasions- und Metastasierungsprozesse eingebunden [Hernandez et al., 2011]. CXCR4 kommt natürlicherweise auf sehr vielen verschiedenen Zellarten wie Leukozyten, haematopoetischen Stammzellen sowie Endothelzellen vor und ist schon seit längerem bekannt. Auf normalen duktalem Epithelzellen der Mamma ist hingegen kein CXCR4 nachweisbar [Müller et al., 2001]. Es ist auf Chromosom 2 am Genlocus q21 kodiert und weist nach der Proteinbiosynthese eine molare Masse von ca. 40 kDa auf. Nach den Modifizierungen, wie zum Beispiel Sulfatierungen, liegt es in oligomeren Formen vor und kann unter anderem mit anderen Rezeptoren Heterodimere bilden. [Luker et al., 2009].

Im Rahmen verschiedener Krebsarten ist eine Expression durch Ovarial-, Ösophagus-, Prostata-, Pankreas-, Mamma- und Lungenkarzinome, sowie durch Melanome und eine Vielzahl anderer Tumoren bekannt [Balkwill, 2004].

CXCR4 spielt eine besondere Rolle bei der Mobilisierung und zielgerichteten Wanderung von Stammzellen in ihre Verwendungsorte. Ebenfalls von besonderer Bedeutung ist der Fakt, dass CXCR4 als Co-Rezeptor für das Eindringen von HIV-1 in CD4+ Zellen dient [Bleul et al., 1996].

2006 wurde ein zweiter Rezeptor für CXCL12 beschrieben: CXCR 7. Sowohl CXCR4 als auch CXCR7 werden durch einige Mammakarzinom und Hirntumorzelllinien exprimiert. Dieser zweite Chemokinrezeptor ist wie CXCR4 Bindungspartner von CXCL12, daneben aber auch Bindungspartner von CXCL11 [Burns et al., 2006]. CXCR7 ist ebenfalls auf Chromosom 2 kodiert, allerdings an Position q37. Das physiologische Vorkommen des Rezeptors wurde unter anderem auf humanen Leukozyten, Monozyten, reifen B-Lymphozyten, CD4+ T-Lymphozyten, basophilen Granulozyten und NK-Zellen, sowie dendritischen Zellen nachgewiesen [Infantino et al, 2006]. Darüber hinaus wird er in Astrozyten des Gehirns und Endothelzellen exprimiert [Shimizu, 2011 u. Sierro, 2007]. Anfangs wurde CXCR7 als *Decoy*-Rezeptor betrachtet, also als Rezeptor ohne intrazelluläre Signalleitung kennzeichnen würde, obwohl er Liganden internalisiert und damit die extrazelluläre Ligandenkonzentration senkt. Aufgrund seines veränderten DRY-Motivs steuert dieser Rezeptor nicht den typischen Signalweg der Pertussistoxin-sensitiven Gi-Protein Signalkaskade der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an, sondern löst über β -Arrestin eine Signalkaskade aus [Odemis et al.; 2012]. CXCR7 hat einen direkten Einfluss auf die Vaskularisierung von Tumoren [Miao et al.; 2007] und kann im Falle von

Prostatakarzinomen als Marker für die Tumoraggressivität genutzt werden [Wang et al., 2008].

1.3 CXCR4/CXCR7 Interaktion und Internalisierung

2009 zeigten Levoye et al., dass beide Rezeptoren nicht nur Rezeptorhomodimere, sondern auch teilweise membranständige Heterodimere mit einer ähnlichen Effizienz bilden, was zu einer sowohl signalleitenden, als auch migrationsmodulierenden Eigenschaft führt [Levoye et al., 2009]. Es ist aufgrund der Heterodimerisierung möglich, einen Rezeptor anzusteuern und die Funktion des Anderen simultan auszulösen, obwohl dieser an seiner Bindungsstelle blockiert, bzw. inhibiert ist. Dies wird zum Beispiel in den CXCR7 zugeschriebenen Effekten deutlich. Dieser Rezeptor soll hauptsächlich für anti-apoptotische und vaskularisierende Effekte an Tumoren sorgen. Es wurde jedoch gezeigt, dass diese Effekte auch bei inaktiviertem CXCR7-Rezeptor über eine Ansteuerung von CXCR4 auslösbar waren [Hattermann et al., 2014]. Tatsächlich lässt sich auf entgegengesetztem Wege die migrationsfördernde Eigenschaft von CXCR4 auch über eine selektive Ansteuerung von CXCR7 beeinflussen.

1.4 Chemokine CXCL11/I-TAC und CXCL12/SDF-1

CXCL12/SDF-1

CXCL12 aus der Gruppe der CXC-Motiv-Chemokine trägt auch die Bezeichnung SDF-1 oder PBSF (pre B cell growth stimulating factor), da es ursprünglich aus einer Bindegewebszelllinie kloniert wurde, bzw. die Eigenschaft besitzt, B-Vorläuferzellen zur Differenzierung in B-Zellen zu stimulieren [Tashiro et al., 1993, Nagasawa et al. 1994]. Das Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 8 kDa und wird durch ein Gen auf dem Chromosom 10 Genlocus q11 codiert. Es existieren verschiedene Isoformen, die durch alternatives Splicing des SDF-1-Gens entstehen, wobei vor allem SDF-1 α und SDF-1 β von physiologischer Bedeutung sind. SDF-1 α ist die aus 89 Aminosäuren bestehende dominante Form, die in allen Organen gefunden wurde, aber einer schnellen Proteolyse im Blut unterliegt. SDF-1 β ist resistenter gegen einen Blut-abhängigen Abbau, stimuliert die Angiogenese und kommt in stark vaskularisierten Organen, wie Leber, Niere oder Milz vor. Im Gegensatz dazu ist SDF-1 γ in aktiven, weniger stark durchbluteten Organen, wie Hirn oder Herz, die jedoch anfälliger sind für Infarkte, anzutreffen [Janowski 2009]. Die Sezernierung der dominanten Form von CXCL12 findet zu großen Teilen durch

Stromazellen des Knochenmarks statt, aber auch durch Epithel- und Endothelzellen in anderen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen. Seine Effekte vermittelt CXCL12 durch Bindung an zwei verschiedene Chemokinrezeptoren, CXCR4 und CXCR7 [Burns et al. 2006].

CXCL11/I-TAC

CXCL11 ist ein Chemokin der CXC-Unterfamilie, das auch die Bezeichnungen I-TAC oder IP-9 (Interferon gamma inducible protein 9) trägt, da seine Genexpression stark durch IFN-beta und IFN-gamma und schwach durch IFN-alpha induziert wird [Rani et al., 1996]. Zusammen mit vielen anderen Vertretern der CXC-Familie, die kein ELR-Motiv aus den Aminosäuren Glutamat, Leucin und Arginin enthalten (ELR⁻), ist auch das Gen von CXCL11 auf dem humanen Chromosom 4 lokalisiert [Erdel et al., 2001]. Es wird stark von den Leukozyten des peripheren Blutes, Pankreas und Leber exprimiert, in moderaten Mengen in Thymus, Milz und Lunge und nur gering in Dünndarm, Plazenta und Prostata [Cole et al., 1998]. CXCL11 kann sowohl von CXCR7 als auch von CXCR3 gebunden werden, wobei letzterer den eigentlich etablierten Rezeptor für dieses Chemokin darstellt [Singh et al., 2013]. Es hat eine starke chemotaktische Aktivität gegenüber Interleukin-2-aktivierten T-Zellen. Diese Wirkung übt es jedoch nicht auf frisch isolierte unstimulierte T-Zellen, Neutrophile oder Monozyten aus. Des Weiteren scheint es eine Rolle in der Migration aktiver T-Zellen während einer IFN-dominierten Immunantwort zu spielen [Cole et al., 1998].

1.5 Chemokine in Tumoren

Chemokine sind für die Wissenschaft auf dem Feld der Immunologie schon lange von Interesse aufgrund ihrer Rolle bei der Steuerung der Migration von Immunzellen. Etwa vor 15 Jahren wurden Chemokine und ihre Rezeptoren zu einem wichtigen Schwerpunkt in der Tumorbilogie im Hinblick auf ihre Fähigkeit die Migration zu steuern, beziehungsweise die Tumorzellen im Sinne der Metastasierung aus ihrem Ursprungsgewebe in die Umgebung zu leiten. Dies bedeutet eine Abwanderung von Zellen des betroffenen in gesundes Gewebe [Kakinuma et al. 2006]. Ein erneutes Interesse an Chemokinen im Zusammenhang mit der Tumorbilogie bedingten Erkenntnisse bezüglich der Tumormikroumgebung. Im Besonderen erfolgte die Untersuchung des Einflusses von nicht-krebsartigen Stromazellen, Immunzellen und extrazellulären Matrixkomponenten auf Wachstum, Überleben, Proliferation und invasive Eigenschaften von Krebszellen.

Diese Bestandteile der Mikroumgebung sind dafür bekannt eine Vielzahl von Molekülen einschließlich Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Chemokinen freisetzen zu können, die Wachstum und Entwicklung von Tumoren modulieren [Wani et al., 2014].

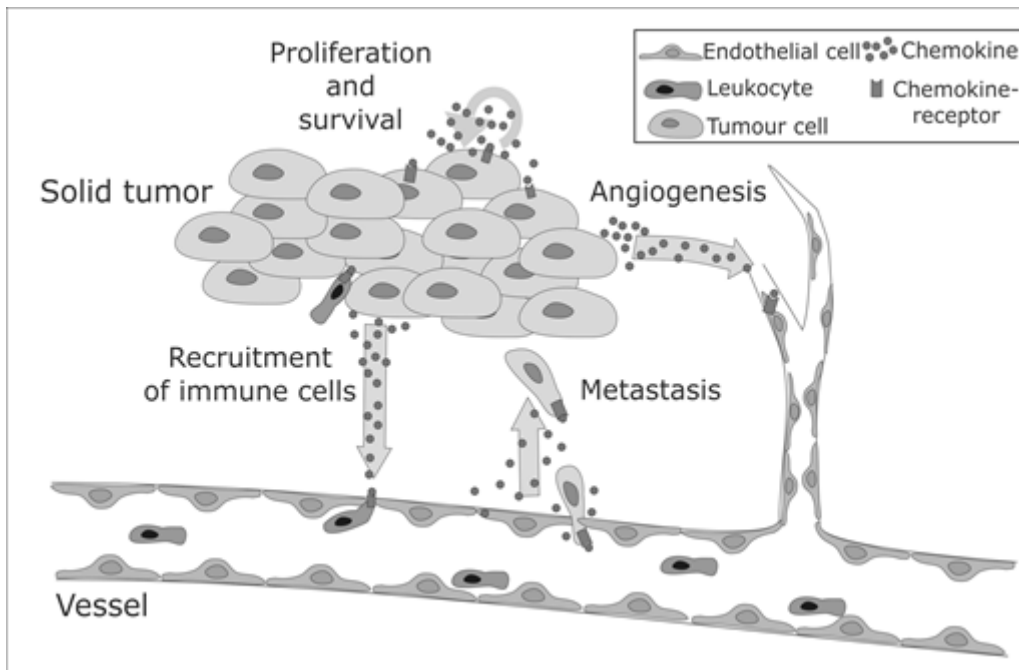


Abbildung 1: Chemokine in der Tumorbildung

Chemokine steuern eine Vielzahl von Prozessen der Tumorentwicklung über, auf den Tumorzellen exprimierte, Chemokinrezeptoren. [AG Mentlein; Mentlein et al., 2013]

Vor allem bei der Metastasierung spielen Chemokine eine große Rolle, da sie an G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf den Oberflächenmembranen der Zielzellen binden und somit eine Signalkaskade aktivieren, welche sich in einer Metastasierung manifestieren kann. Zu diesem Zweck müssen sie sich vorher auf den Zellen des Primärtumors befunden haben, von dort aktiv auswandern und über Gefäßsysteme zum Sekundärorgan gelangen. Der Prozess wird hierbei wesentlich durch die Angiogenese erleichtert, die ein Ausschwemmen der Zellen aus dem Primärtumor ins Blut verstärkt und ein Wachstum/Überleben der metastasierten Zellen fördert. Die Expression von Chemokinen und ihren Rezeptoren ist in vielen malignen Tumoren verändert und führt daraufhin zu einem abnormalen Rezeptorsignal. Zu dieser Veränderung kommt es aufgrund der Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen oder einer Aktivierung von Onkogenen, die eine Rolle bei der Regulation von Chemokinen spielen. Weiterhin beeinflusst die deregulierte Expression von Transkriptionsfaktoren auch die Menge an Chemokinen und Chemokinrezeptoren und fördert somit die Tumorgenese [Purvaba J. Sarvaiya et al., 2013].

1.6 Visualisierung von Tumoren *in vivo* über Chemokinrezeptoren

Chemokine sind für ihre Wirkung bezüglich des Immunsystems und der Endothelzellaktivierung und -proliferation bekannt. Dennoch häufen sich die Aussagen über CXC-Chemokin-Rezeptoren, wie CXCR4 und CXCR7, im Hinblick auf ihre kritische Rolle bei Wachstum und Entwicklung maligner Tumoren. Eine hohe CXC-Rezeptor-Expression geht oft einher mit schlechter Prognose, chemotherapeutischer Resistenz und Metastasierung. Die Effekte dieser Rezeptoren in der Tumorgenese werden zum Großteil durch die Interaktion der Liganden CXCL11 und CXCL12 ermöglicht. CXCR4 ist in den letzten Jahren besonders in den Fokus gerückt, da der Rezeptor von vielen Tumorzellen exprimiert wird und somit auch ein Ziel für eine mögliche Behandlung bietet. Eine nicht-invasive Methode, die CXCR4 detektiert, könnte Diagnose und Therapiewahl stark erleichtern. Eine solche Möglichkeit bietet die Nutzung eines PET-Markers, der antagonistisch an den Rezeptor bindet. Die PET, Positronen-Emissions-Tomographie, ist heute neben CT und MRT eine der wichtigsten bildgebenden Untersuchungsmethoden. Bei der nuklearmedizinischen Diagnostik kommen instabile Stoffe (Radionuklide) zum Einsatz, die beim Zerfall Positronen aussenden. Diese sind gekoppelt an eine biologische Sonde (z.B. Glucose), die das Isotop zu seinem Zielgewebe trägt. Glucose wird häufig verwendet, da die Tumorzellen sie aufgrund ihres gesteigerten Stoffwechsels vermehrt aufnehmen. Die PET kann so Aufschluss über kleinste Stoffwechselveränderungen geben und erlaubt eine frühzeitige Auskunft über krankhafte Prozesse. In Kombination mit CT oder MRT können im Anschluss Strukturen sichtbar gemacht werden.

1.7 Synthetische CXCR4- und CXCR7-Liganden

Von der Arbeitsgruppe um Prof. Hans-Jürgen Wester von der Technischen Universität München wurden die synthetischen Chemokinliganden Phe-5-AcTZ (Abb.2), HexGua (Abb. 3) und Ga-CPCR4-2 (Abb. 4) entwickelt, die an den Chemokinrezeptor CXCR4 binden. Der verwendete Ligand FC131 (Abb. 5) wurde von der Arbeitsgruppe Fujii et al. weiterentwickelt [Tamamura et al., 2005] und durch die Arbeitsgruppe Wester als Ausgangspunkt der Ligandensynthese ebenfalls genutzt. Ziel war die Entwicklung spezifischer Liganden für Chemokinrezeptoren mit der Möglichkeit, diese für radiologische Untersuchungsmethoden wie MRT, CT, PET etc. zu markieren und so zu einer Visualisierung und Diagnostik des Tumors beizutragen.

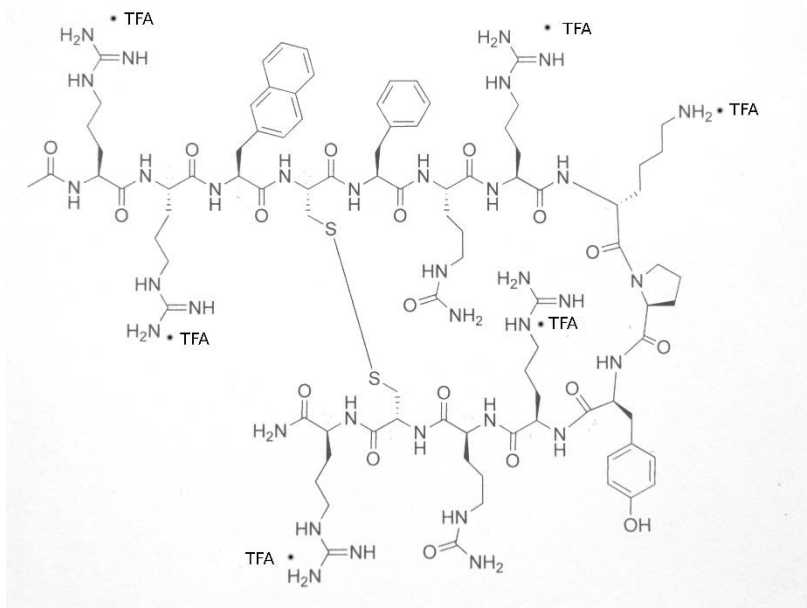


Abbildung 2: Strukturformel von Phe5-ActZ
Phe5-ActZ ist stark positiv geladen.

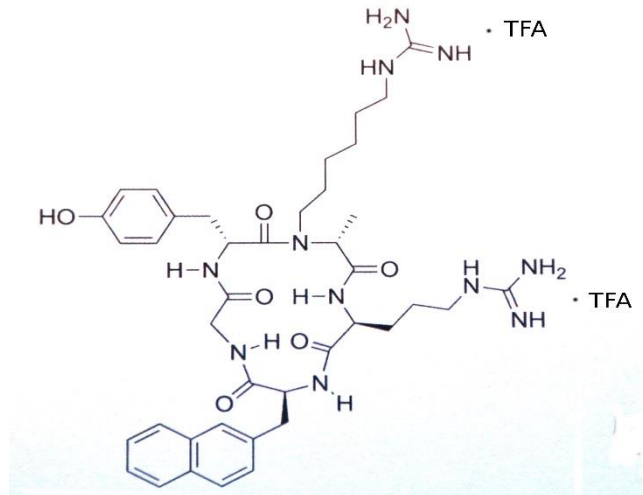


Abbildung 3: Basis-Strukturformel von HexGua
Zur Verbesserung der Stoffeigenschaften wurden in den Derivaten hydrophile Gruppen und Chelatoren zur Rבודetection ergänzt.

Auf Grundlage der bereits bekannten Antagonisten wie zum Beispiel AMD3100, CCX733 und ihrer symmetrischen Bestandteile, wurden ebenfalls symmetrische Dimere auf Grundlage zyklischer Pentapeptide hergestellt. AMD3100 und CCX733 wirken auf die Rezeptoren als Antagonisten gegenüber CXCL11 und CXCL12 und werden unter anderem therapeutisch eingesetzt. AMD3100 ist als CXCR4-Hemmer zugelassen und wurde unter dem Markennamen Plerixafor® ursprünglich in der HIV-Therapie eingesetzt [Flomenberg et al., 2005].

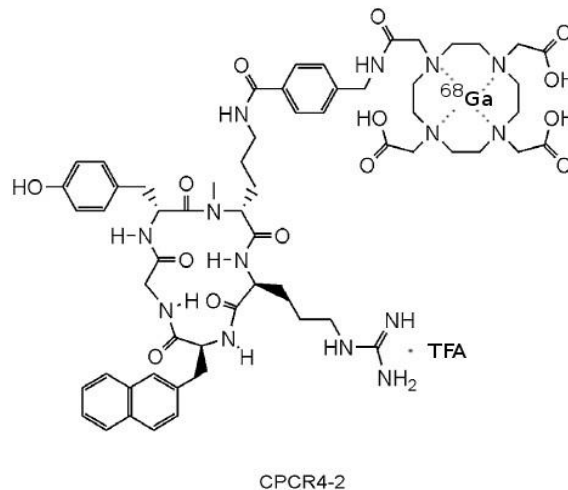


Abbildung 4: Strukturformel von Ga-CPCR4-2

Das kleine ^{68}Ga gelabelte zyklische Peptid CPCR-4 wurde als geeigneter Tracer und für die Markierung von CXCR4 in vivo durch PET-Scans identifiziert.

Als Mozobil® findet AMD3100 heute in Kombination mit G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) Anwendung zur Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen in das periphere Blut zur Entnahme und anschließenden Transplantation bei erwachsenen Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen und Multiplen Myelomen, die selbst nicht genug Stammzellen mobilisieren können [De Clerq, 2009].

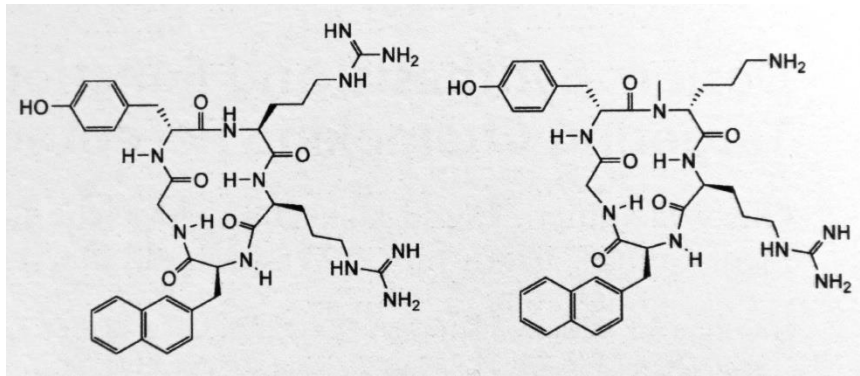


Abbildung 5: Strukturformel von FC131

Die original zyklische pentapeptidgerge Form FC131 (4) ist links zu sehen und das Derivat Nummer 7, welches zur Dimerisierung genutzt wird, rechts.

Bei den synthetischen Liganden tragen alle Seitenketten zur Bindungsfähigkeit bei. Als praktische Weiterentwicklung wurde 2011 das kleine ⁶⁸Ga gelabelte zyklische Peptid CPCR-4 als geeigneter synthetischer Ligand für die Markierung von CXCR4 *in vivo* identifiziert [Gourni et al., 2011].

Zur besseren Lösungsfähigkeit der zum Teil stark geladenen Moleküle wurden, bis auf FC131, alle mit Trifluoressigsäure (TFA) ergänzt [Katz, 1954].

Mit den Substanzen Phe-5AcTZ, HexGua, Ga-CPCR4-2 und FC131 stehen CXCR4-spezifische Liganden zur Verfügung, die durch die Kopplung an das instabile Gallium-68 als spezifisches Kontrastmittel für PET-Diagnostik genutzt werden können.

2 Fragestellung

Die Aktivierung und Steuerung der Proliferation, Metastasierung und Apoptoseresistenz verschiedener Zellen über entsprechende Chemokinrezeptoren und ihrer natürlichen Liganden ist schon seit längerem Gegenstand der Tumorforschung, um Grundlagen zu erfahren und Angriffspunkte für neue Medikamente und Diagnostik zu entdecken.

Die Arbeitsgruppe der Nuklearmedizin der Technischen Universität München um Prof. Wester hat mit der Entwicklung detektionsfähiger neuer Liganden für Chemokinrezeptoren, insbesondere CXCR4, einen wichtigen Schritt hinsichtlich der klinischen Anwendbarkeit als Diagnostikum gemacht.

Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob die synthetischen Liganden zu einer spezifischen, alleinigen Internalisierung des Rezeptors CXCR4 führen oder ob zu einer Cointernalisierung von CXCR4 und CXCR7 kommt. Dies sollte beispielhaft an verschiedenen Zellarten mit unterschiedlichem Expressionsprofil für die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 untersucht werden. Zum Nachweis der Internalisierung bei Stimulation mit den synthetischen und natürlichen Liganden sollten immunzytochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die extrazellulären Domänen der Rezeptoren durchgeführt werden. Durch Internalisierung erhöht sich gegebenenfalls die Verweildauer in der Tumorzelle, sodass klinisch längere Messzeiten nach Liganden-Gabe bzw. weniger Rauschen, durch weniger unspezifisch flottierende Radionuclide, und damit bessere Signale möglich wären. Um zu überprüfen, ob die vier verschiedenen Liganden biologische Effekte haben, wurde exemplarisch die Rettung vor chemisch induzierter Apoptose gewählt. Diese sollte ebenfalls beispielhaft an verschiedenen Zellen untersucht werden. Untersuchungen zu Internalisierung und zum Einfluss auf die Apoptose wurden jeweils im Vergleich zu den natürlichen Liganden CXCL12 und/oder CXCL11 vorgenommen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 35M, Zeiss, Jena, D
Inverses Mikroskop	CK2, Olympus Optical Co., LTD, Japan Axiovert 35M, Zeiss, Jena, D
Photometer	Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, UK
Real-Time PCR Gerät	ABI Prism-7700 SDS, Applied Biosystems, Foster City CA, USA
Scanner	Epson Perfection V750Pro Epson Deutschland, Meerbusch, D
Thermocycler T-Gradient	Biometra, Göttingen, D
Zentrifuge	DigifugeGL, Heraeus, Hanau, D Centrifuge 5417R, Eppendorf, HH, D

3.1.2 Chemikalien

BSA (Bovines Serumalbumin)	BIOMOL, Research Labs., Inc., USA
Camptothecin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol- dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
EDTA	Fermentas, St. Leon-Rot, D
FCS (Fötale Kälberserum),	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
Immu-Mount	Thermo Electron Corp., Pittsburgh, USA
Microscopy Aquatex	Merck, Darmstadt, D
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, dt. Niederlassung, Hilden, D
Saccharose	ROTH, Karlsruhe, D
Staurosporin	Calbiochem, Darmstadt, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

3.1.3 Puffer

PBS	8,0 g NaCl (136 mM), 0,2 g KCl (2,7 mM), 0,24 g KH ₂ PO ₄ (1,8 mM), 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (8 mM); auf 1 l H ₂ O dest., pH 7,2-7,4
Trypsin-Lsg.	24 ml PBS, 1 ml 2,5 % Trypsin, 37 mg EDTA, steril filtriert

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Kulturschalen	Greiner, Frickenhausen, D
96-Well-Platten für rtPCR	Sarstedt, Nürnberg, D
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe, D
sterile Plastikröhrchen	Sarstedt, Nürnberg, D
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg, D
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnberg, D
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg, D

3.1.5 Stimulantien und Inhibitoren

CCX733 (11G8); 100 nM	Chemocentryx, Mountain View, Calif., USA
rH EGF; 20 ng/ml	Immuno Tools, Friesoythe, D
rH I-TAC; 1 nM, 5 nM, 10 nM	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
rH SDF-1 α ; 1 nM, 5 nM	Immuno Tools, Friesoythe, D
AMD 3100, 5 μ M	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

3.1.6 Antikörper

Wheat Germ Agglutinin (WGA), Alexa Fluor 647 conjugate	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, D
---	---

Primärantikörper:

goat- α -cxcr4; ab1671

Abcam, Cambridge, UK

mouse- α -cxcr7; 11G8

Chemocentryx, Mountain View, Calif., USA

Sekundärantikörper:

donkey- α -goat-555; A21432

Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, D

goat- α -mouse-488; A11001

Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, D

Liganden:

FC 131

TU München, Wester H.J.

Phe-5-AcTZ

TU München, Wester H.J.

Ga-CPCR4-2

TU München, Wester H.J.

HexGua

TU München, Wester H.J.

3.1.7 Fertigsystem ("Kit")

TaqMan® Universal Master Mix
mit AmpErase® UNG, 4304437

Applied Biosystems, Branchburg, NJ,
USA

3.1.8 Enzyme

DNase (RNase-frei)

Fermentas, St.Leon-Rot, D

ReverseAid™ TH Minus M-MuLV

Fermentas, St.Leon-Rot, D

Reverse Transkriptase

RNase (DNase-frei)

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

3.1.9 TaqMan® Primer Probes

alle von Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA

<u>Primer</u>	<u>ID-Nummer</u>	<u>Reportersequenz</u>
hGAPDH	Hs99999905_m1	ATTGGGCCTGGTCACCAGGGCTG
hCXCR3	Hs00171041_m1	GCCATGGTCCTTGAGGTGAGTGACC
hCXCR4	Hs00607978_s1	TGTCCTGCTATTGCATTATCATCTC
hCXCR7	Hs00664172_-s1	AGCTCACGTGCAAAGTCACACACCT
hCXCL11	Hs00171138_mi_M	CTACAGTTGTTCAAGGCTTCCCCAT
hCXCL12	Hs00171022_m1	CCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAA

3.1.10 Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
(PAN Cat.No P04-05540)

3.1.11 Zelllinien

MCF-7 Mammakarzinomzelllinie, epithelialen Charakters,
Cell Line Service, Eppelheim, D

SK-NSH Neuroblastomzelllinie, neuralen Ursprungs und epithelialen Charakters,
freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. Udo Schumacher,
Leiter Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie, UKE Hamburg

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturarbeiten

3.2.1.1 Allgemein:

Alle Zellkulturarbeiten mit den genutzten lebenden Tumorzellen erfolgten in steriler Umgebung. Um eine Kontaminierung der Zellkultur mit Bakterien und Pilzen zu verhindern, ist auf sauberes Arbeiten zu achten. Die verwendete Werkbank, sowie Einmalhandschuhe und sämtliche genutzten Geräte wurden vor der Benutzung mit 70 Vol% Ethanol desinfiziert. Nach Abschluss der Arbeit kamen sowohl 70 Vol% Ethanol, als auch eine Bestrahlung mittels UV-Lampe zum Einsatz. Sämtliche nicht-autoklavierbare Materialien wurden regelmäßig entweder mithilfe eines Sterilfilters mit einer Porengröße von 0,2 µm aufbereitet oder mit 70 Vol% Ethanol desinfiziert.

3.2.1.2 Anzucht der Zellen

Die Kultivierung aller Zellkulturen erfolgte im Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % in Zellkulturflaschen. Sowohl die MCF-7- als auch die SKNSH-Zellen wurden als adhärente Monolayerkulturen in Kulturmedium für Tumorzelllinien angezüchtet, das sich wie folgt zusammensetzt: DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle Medium) mit 4,5 mg/ml Glucose unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 3 % L-Glutamin. Zu Beginn der Zellzucht wurde dem Kulturmedium 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt, um eine mögliche Bakterieninfektion zu verhindern. Fötales Kälberserum als Bestandteil des Kulturmediums wurde für 30 Minuten bei 56 °C

inaktiviert und anschließend steril filtriert. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte portioniert bei -20 °C.

3.2.1.3 Mediumwechsel

Alle zwei bis drei Tage wurde die Konfluenz der Zellen mikroskopisch beurteilt. Sofern die für die entsprechende Zelllinie optimale Zelldichte noch nicht überschritten war, erfolgte ein Mediumwechsel dreimal wöchentlich. Zum Wechseln des Mediums wurden die Zellkulturflaschen leicht geschwenkt und das Nährmedium, sowie nicht adhärente Zellen vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Das entnommene Volumen wurde im Anschluss durch bereits vorgewärmtes, frisches Kulturmedium ersetzt.

3.2.1.4 Subkultivierung der Zellen

Um die Zellen in einer exponentiellen Wachstumsphase zu halten, erfolgte die Subkultivierung bei einer Zellkonfluenz von 70-80 %, in einem für die jeweilige Zelllinie optimalen Verhältnis. Die Lagerung aller erforderlichen Medien, PBS und der Trypsin-EDTA-Lösung erfolgte bei 4 °C. Zur Passagierung bei entsprechender Zelldichte wurde das Medium abgesaugt und die konfluent wachsenden Zellen mit vorgewärmtem PBS gespült. Zur Ablösung des Zellrasens von der Oberfläche der Kulturflaschen, wurde dieser mit einer Trypsin-EDTA-Lösung behandelt, die nach 30 s abgesaugt wurde. Trypsin ist eine Protease, die z.B. Membranproteine, welche die Haftung der Zellen an der Zellkulturflasche vermitteln, spaltet. Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 37 °C je nach Zellart drei bis fünf Minuten. Während der Trypsinreaktion zeigten die Zellen eine Abrundung und Ablösung vom Boden der Kulturflasche, deren Grad regelmäßig mikroskopisch kontrolliert wurde. Die Einwirkzeit der Lösung wurde möglichst gering gehalten, da durch Trypsin auch lebenswichtige Proteine der Zellen verdaut werden. Mit Hilfe der Zugabe von 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium wurde diese enzymatische Proteolyse gestoppt, da Bestandteile des fötalen Kälberserums das Trypsin hierbei inaktivieren. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren des Mediums wurde die Lösung der Zellen und deren Vereinzelung begünstigt, sodass daraufhin die Zellzahl bestimmt werden konnte.

Anschließend wurde die Zellsuspension in mit frischem Zellkulturmedium bestückte Zellkulturflaschen überführt und je nach benötigter Zellzahl ausgesät.

3.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Alle Zellzählungen erfolgten mit Hilfe einer Neubauer- Zählkammer. Zu diesem Zweck wird, wie oben beschrieben, die Zellsuspension hergestellt, 30 µl von dieser mit 30 µl Trypanblau gemischt und im Anschluss daran die Zählkammer damit gefüllt.

Vitale Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop ungefärbt, da Trypanblau die Eigenschaft hat in irreversibel geschädigte Zellen mit veränderten Membraneigenschaften zu penetrieren und sich dort mit seiner negativen Ladung an interne Proteine zu binden. Dies führt zu einer mikroskopisch nachweisbaren Blaufärbung dieser Zellen. Die Anzahl der lebenden, ungefärbten Zellen in den vier Eckquadranten der Zählkammer wurde ausgezählt und gemittelt. Die erhaltene Zellzahl mal 10^5 ergibt die Anzahl der Zellen je ml Zellsuspension. Da Trypanblau zytotoxisch ist, muss die Auswertung innerhalb von drei bis fünf Minuten nach der Farbstoffzugabe erfolgen.

3.2.1.6 Einfrieren und Lagerung der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden mit dem entsprechenden Einfriermedium, sowohl für die MCF-7- als auch für die SK-NSH-Zellen Zellsuspensionen mit Zellkonzentrationen von 1,6 Millionen pro ml eingestellt. 900 µl dieser Suspensionen wurden im Anschluss mit 100 µl Zellkultur- reinem DMSO versetzt und in Kryo-Röhrchen gefüllt. Um die Zellen vor zu schnellem Einfrieren zu schützen, wurden die Röhrchen einzeln mit Zellstoff umwickelt und anschließend bei -70 °C für 24 Stunden eingefroren, bevor sie zur Langzeitkonservierung in Behältern mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C archiviert wurden.

3.2.1.7 Auftauen von eingefrorenen Zellen

Die Zellen in den Kryo-Röhrchen wurden im Wasserbad bei 37 °C rasch aufgetaut, dann mit vorgewärmtem 5 ml Standard- Kulturmedium versetzt und zentrifugiert (5 Minuten bei 600 rpm). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml warmem Medium resuspendiert und anschließend in eine 25-cm²-Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden erfolgte die mikroskopische Begutachtung der Zellen und der erste Mediumwechsel fand statt, um abgestorbene und nicht angewachsene Zellen zu entfernen. Für ein besseres Wachstum der Zellen kann optional der FKS-Anteil auf bis zu 20 % erhöht werden.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA- Isolierung

Nachdem die Zellen zwei bis drei Tage lang in einer kleinen Zellflasche kultiviert wurden, wurden sie zunächst mit warmem PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml Trizol-Reagenz versetzt. Dies führte zur Lyse der Zellen, die im Anschluss mit einem Zellschaber abgelöst und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurden. Für die RNA-Isolierung nicht direkt im Anschluss an die Zellernte statt, wurden die Proben bei -20 °C eingefroren. In diesem Fall erfolgte das Zentrifugieren zur Entfernung der Zelltrümmer bei 800 x g bei 4 °C für fünf Minuten im Anschluss an das Auftauen. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Chloroform überschichtet, für ca. 30 Sekunden gut durchgeschüttelt und zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 15 Minuten bei 12000 x g und 4 °C. Der Inhalt der Proben teilte sich nun in drei Phasen, wobei die untere rötliche Phase chloroform- und phenolhaltig ist. Die untere und die Interphase wurden verworfen. Die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen, in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und mit 250 µl Isopropanol ausgefällt. Nach mehrmaligem invertieren der Probe, wurde diese 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss für 10 Minuten bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die RNA sedimentierte hierdurch in einem Gel-artigen Pellet am Boden des Gefäßes. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 75 % Ethanol zum Waschen geschüttelt und für 5 Minuten bei max. 7500 x g und 4 °C nochmals abzentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde vollständig abgenommen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, je nach Pelletgröße in 20-30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und 10 Minuten bei 56 °C gelöst. Eine kurzfristige Lagerung der Probe bei -20 °C ist möglich. Für die längerfristige Verwahrung sollte sie jedoch bei -70 °C eingefroren werden.

3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNA-Proben wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Die Probe wurde bei 200-facher Verdünnung gegen Wasser gemessen. Der

RNA-Gehalt wurde nach photometrischer Messung durch folgende Formel berechnet:

$$\frac{\text{OD}_{260} * 40 * \text{Verdünnung}}{1000} = \text{RNA-Gehalt } (\mu\text{g/ml})$$

Um ein Maß für die Reinheit der Probe zu erhalten, wurde außerdem die Absorption bei 280 nm bestimmt. Der Verunreinigungsgrad der RNA-Lösung durch Proteine und Phenole wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dabei entspricht ein Quotient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}} = 2,0$ hochreiner RNA. Der Quotient sollte sich im Bereich 1,7-2,1 bewegen. Durch Verunreinigungen mit Proteinen und Salzen wird dieser Quotient zu kleineren Werten verschoben.

3.2.2.3 DNase-Verdau und Aufreinigung der isolierten RNA

Die cDNA- Synthese erfordert einen hohen Reinheitsgrad der isolierten RNA. Ein zusätzlicher Verdau durch DNase mit anschließender Aufreinigung der RNA, kann eventuelle Verunreinigungen durch genomische DNA entfernen. Hierfür wurden 1µg RNA mit Rnase-freiem Wasser auf 7 µl aufgefüllt und dann je 1 µl DNase Puffer und DNase hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37 °C wurden durch Zugabe von 1 µl EDTA, die für die DNase essentiellen Magnesium-Ionen chelatisiert. Die anschließende Inkubation bei 65 °C für 5 Minuten inaktivierte das Enzym und löste Sekundärstrukturen der RNA auf. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis heruntergekühlt.

3.2.2.4 cDNA-Synthese

Bei der Herstellung von cDNA findet eine Reverse Transkription (RT) der mRNA in cDNA statt, wobei die Sequenzabfolge der mRNA als Vorlage dient. Sie wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in die komplementäre DNA umgeschrieben. Bei dem Enzym *Revert Aid TM H Minus M-MuLV RT* handelt es sich um eine spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase. Die Tatsache, dass mRNA-Moleküle an ihrem 3'-Ende polyadenyliert sind, ermöglicht es einen Oligo-dT-Primer als Startpunkt für die cDNA-Synthese zu verwenden, welcher ein Oligonukleotid aus ca. 15 Thymidin-Nukleotiden ist. Dieses bindet spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA. Neben spezifischen Primern können auch Random Hexamer Primer, die eine Mischung einzelsträngiger Nukleotidsequenzen aus sechs zufällig zusammengesetzten Basenpaaren darstellen, eingesetzt werden. Sie lagern sich den RNA-Strängen komplementär an und bilden somit die doppelsträngigen Startpunkte der

Reversen Transkriptase. Bei der Synthese wurden jeweils 1 µg RNA eingesetzt und alle Inkubationsschritte erfolgten im Thermocycler T-Gradient. Die zuvor gereinigte und heruntergekühlte Probe wurde mit 2 µl Hexamer Primer versetzt, 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurden der Probe 4 µl 5x *Reaction* Buffer, 2 µl dNTP-Mix und 1 µl Wasser zugeführt. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde der Ansatz 5 min bei 25 °C gehalten, um es den Primern zu ermöglichen, sich an die mRNA-Vorlage anzulegen. Danach wurde zügig 1 µl der Revert *Aid TM H Minus M-MuLV* Reversen Transkriptase hinzu pipettiert. Die Reverse Transkription erfolgte 10 Minuten bei 25 °C und anschließend 60 Minuten bei 42 °C. In einem finalen Schritt wurde das RT-Enzym durch Erhitzen für 10 Minuten auf 70 °C inaktiviert und die Reaktion gestoppt.

3.2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR), *rt-PCR*

Allgemein: Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, gezielt spezifische DNA-Fragmente *in vitro* zu vervielfältigen, das heißt sie ermöglicht die Herstellung von millionenfachen Kopien bestimmter Nukleotidsequenzen. Durch diesen als Amplifikation bezeichneten Vorgang können auch sehr geringe Mengen an DNA nachgewiesen und der Klonierung zugänglich gemacht werden. Das entscheidende Prinzip ist hierbei die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte. Der PCR-Zyklus startet mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges bei 95 °C, wobei komplementäre Einzelstränge entstehen, die im Weiteren als Vorlage dienen. Im zweiten Schritt, dem Annealing, hybridisieren synthetische Oligonukleotide, die sog. „Primer“ bei einer Temperatur von 65 °C an die komplementären Einzelstränge. Dabei wird die Sequenz der Primer so gewählt, dass sie spezifisch eine Sequenz der Templates erkennen. Sie lagern sich infolgedessen nur am gewünschten Genabschnitt an. Durch das Enzym DNA-Polymerase erfolgt im dritten Schritt die Amplifikation des durch die Primer markierten Sequenzabschnittes. Somit entstehen zwei doppelsträngige DNA-Fragmente des ausgesuchten Abschnittes. Durch 40-fache Wiederholung dieses Zyklus vervielfältigt sich deren Anzahl exponentiell. Bei der verwendeten *real-time* PCR handelt es sich um eine Weiterentwicklung der konventionellen, semiquantitativen Endpunkt-PCR.

Bei letzterer wurde im Anschluss an die PCR das PCR-Produkt durch Agarose-Gelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert. Die neuere Methode verbindet die Vervielfältigung von Nukleinsäuren mittels der PCR mit der gleichzeitigen Quantifizierung der DNA-Menge durch Fluoreszenzmessungen während der einzelnen PCR-Zyklen eines Laufes. Wird dabei auch die Menge eines anfänglich vorhandenen Zielgens bestimmt,

spricht man speziell von der quantitativen PCR. Das Fluoreszenzsignal, das man bei jedem Reaktionszyklus erhält, ist direkt proportional zur Menge an vorhandener DNA, d.h. je stärker das Fluoreszenzsignal ist, desto mehr PCR-Produkt ist in der Reaktion amplifiziert worden. Die Auswertung kann in Relation zu einem mitgemessenen Referenzgen erfolgen, z.B. das Gen des Enzyms GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), da es als Bestandteil der Glykolyse in fast allen Körperzellen vorkommt und somit gut geeignet ist. Um das Expressionsverhalten einiger weniger Gene sehr präzise zu untersuchen, eignet sich die quantitative Taqman-RT-PCR, unter Ausnutzung des Prinzips des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET), als Verfahren. Im Rahmen des FRET wird die Energie eines durch eine Lichtquelle angeregten Farbstoffes (Donor/ Reporter) strahlungsfrei auf einen zweiten sich in ausreichender Nähe befindlichen Farbstoff (Akzeptor) übertragen, wenn sich Emissionsspektrum des Donors und Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Das Akzeptorfluorochrom fluoresziert daraufhin. Die Energie kann, wie im Falle der Taqman-Sonde, auch auf einen Quencher übertragen werden, der diese in Form von Wärme wieder abgibt.

Die Taqman-RT-PCR beruht auf dem Prinzip der 5'-Nuklease-Aktivität der eingesetzten Polymerasen. Der Ansatz enthält neben den normalen Primern für eine PCR eine Frequenz-spezifische Oligo-Nukleotid-Sonde, welche am 5'-Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit dem Quencher TAM-RA markiert ist, der die Fluoreszenz von FAM löscht. Solange die Sonde intakt ist, wird durch das FRET-Prinzip die Fluoreszenzenergie des Reporterfarbstoffes auf den Quencher übertragen. Eine stattfindende Fluoreszenzemission wird dadurch verhindert. Während der Gegenstrangsynthese kommt es jedoch zu einer räumlichen Trennung von Quencher und Reporter, durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase. Infolgedessen kann ein Signal detektiert werden. Dieser Vorgang wiederholt sich nun bei jedem PCR-Zyklus. Dadurch ist während der exponentiellen Phase der PCR, die gemessene Zunahme der Fluoreszenz direkt proportional zum entstandenen PCR-Produkt, welches wiederum proportional zur Templatmenge („Template“ = einzelsträngige DNA, die mit der DNA-Polymerase markiert wird) ist.

Vorgehen: Die eingesetzte Menge an cDNA betrug 20ng, welche auf eine Konzentration von 10 ng/µl vorverdünnt wurde. Nun wurden 2 µl cDNA je Well in eine hitzestabile, optisch durchlässige 96-Well-Platte gegeben. Im Anschluss wurden 18 µl eines Master Mixes hinzugefügt, welcher sich aus 1 µl Forward Primer (10 µM) und Reverse Primer (10 µM), sowie 7 µl Wasser und 10 µl Taqman Universal PCR Master Mix zusammensetzte. Nach

Verschluss der 96-Well-Platten mit einer Folie erfolgte die Amplifikation der Proben im ABI PRISM 7700 SDS (Applied Biosystems) nach dem folgenden Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1	50 °C	2 min	1
2	95 °C	10 min	1
3	95 °C	15 sek	40
	60 °C	1 min	

Auswertung: Der für die Quantifizierung ausschlaggebende Schwellenwert der Fluoreszenz ist der C_t -Wert, der sog. cycle threshold. Dieser ist definiert als der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz der Probe erstmalig signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Durch Verwendung des ΔC_t -Wertes lässt sich die relative Genexpression des Zielgens in der Probe bestimmen, da für jede Probe die GAPDH als Referenzgen mitgemessen wurde. Anhand dieses Bezugswertes ist es möglich, aus einem bestimmten ΔC_t -Wert eine Templatekonzentration zu ermitteln. Der ΔC_t -Wert wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta C_t = C_{t\text{Probe}} - C_{t\text{GAPDH}}$$

Durch die Formel $2^{-\Delta C_t}$ ließ sich im Anschluss die relative Genexpression errechnen.

3.2.3 Morphologisch-optische Methoden

3.2.3.1 Native immunzytochemische Färbung

Allgemein: Die Immunhistochemie ist eine Methode, die genutzt wird, um einzelne Zellorganellen, -bestandteile oder -markerproteine spezifisch zu markieren bzw. sichtbar zu machen. Dabei beruht das Prinzip der Methode auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Man unterscheidet eine direkte Färbung, bei der der primäre Antikörper mit einem Marker gekoppelt ist, von einer indirekten Färbung, bei der ein mit dem Marker gekoppelter sekundärer Antikörper gegen das Fc-Fragment des primären eingesetzt wird. Man spricht von Immunfluoreszenz, wenn es sich bei dem Marker um einen fluoreszierenden Farbstoff handelt. Ein Vorteil der indirekten Immunfluoreszenz ist die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper und die daraus resultierende Amplifikation des Signals. Wenn Zellen jedoch autofluoreszieren oder der Sekundärantikörper mit Antigenen der verwendeten Probe kreuzreagiert, kann es auch zu falsch-positiven Signalen

kommen. Durch Vorinkubation der Zellen mit präabsorbierenden Antiseren, die Antikörper der Probe enthalten, kann dies jedoch verhindert werden. Bei einer Kolokalisation verschiedener Proteine können diese mit Hilfe einer Doppelfärbung visualisiert werden.

Vorgehen: Bei der durchgeführten indirekten immunzytochemischen Färbung wurde zunächst der Rezeptor mit dem Primär-Antikörper markiert. Dieser bindet mit seiner Fab-Region an den Zielrezeptor. Um diesen sichtbar zu machen erfolgt anschließend eine Markierung mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper, der mit seinem Fab-Teil an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet.

Sowohl die SKNSH, als auch die MCF-7 Zellen wurden unfixiert bei 4 °C gefärbt. Die MCF-7 Zellen wurden zu diesem Zweck am Vortag auf entfetteten, PDL-beschichteten 100mm Deckgläschen (0,2 % Poly-D-Lysin) ausgesät. Die SKNSH-Zellen benötigten für eine entsprechende Zelldichte zwei Tage. Nachdem die Zellen mit PBS plus 0,5 % BSA gewaschen wurden, erfolgte ein Mediumwechsel auf DMEM plus 1 % BSA. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für 30 Minuten bei 37 °C und auf diese eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Zuletzt erfolgte eine Lagerung bei 4 °C, um die Zellen auf diese Temperatur zu äquilibrieren. Alle darauffolgenden Schritte bis zur Fixierung erfolgten ebenfalls bei 4 °C.

Zunächst wurden die Zellen zwei mal fünf Minuten mit eiskaltem PBS plus 0,5 % BSA und 0,5 % Glycerin (Waschlösung) gespült. Die Deckgläschen wurden in eine neue 6-Well-Platte überführt und mit 50 µl Primärantikörper überschichtet. Nun erfolgte die Inkubation für 60 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Die Sekundärantikörper wurden im Dunkeln verdünnt.

Die verwendeten Primärantikörper Ziege-anti-CXCR4 (Abcam) und Maus-anti-CXCR7 (Chemocentryx) wurden je 1:100 in DMEM+ 1 % BSA verdünnt. Im Gegensatz dazu wurden die Sekundärantikörper Esel-anti-Ziege555 und Ziege-anti-Maus488 (Invitrogen) 1:1000 verdünnt. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Plättchen erneut gespült und in neue 6-Well-Schalen umgesetzt. Zunächst wurden die Zellen mit 100 µl Esel-anti-Ziege 555 überschichtet und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte erneut ein Spülgang und ein umsetzen der Plättchen, bevor 100 µl des zweiten Sekundärantikörpers, Ziege-anti-Maus488, dazu gegeben wurden.

Nach weiteren 45 Minuten Inkubationszeit wurden die Deckgläschen nach dem Spülen mit Waschlösung in Einzelschalen umgesetzt und 70 µl des jeweiligen Liganden hinzugesetzt, wobei 70 µl DMEM+ 1 % BSA als Kontrolle dienten. Nun wurde den Zellen für 8 Minuten bei 37 °C die Möglichkeit zur Internalisierung gegeben. Im Anschluss wurden sie nochmals gespült, einmal kurz mit PBS + 0,5 % BSA gewaschen und die 6-Well-Platte erneut

gewechselt, um die Fixierung für 10 Minuten mit Aceton-Methanol vorzunehmen. Zur gründlichen Reinigung erfolgte eine dreimalige Spülung mit PBS + 0,5 % BSA und ein Schalenwechsel, an den sich zur Sichtbarmachung der Zellgrenzen eine 10-minütige Inkubation mit 1:200 verdünntem wheat germ agglutinin- Alexa 647 (WGA) und eine 45-minütige Kernfärbung mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) anschloss. Nach einer Abschlussspülung zuerst kurz mit PBS + 0,5 % BSA, dann mit H₂O wurden die Plättchen mit Immu-Mount auf Objektträgern eingedeckelt und konnten nach einer 24 stündigen Aushärtungszeit bei 4 °C unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35M ausgewertet werden.

3.2.3.2 Quantifizierung der Internalisierung

Zur Quantifizierung der Internalisierung wurde eine Methode angewandt, die erstmals in der Arbeitsgruppe etabliert wurde [Hattermann et al., 2014]. Dabei wurden digitale Fotografien von CXCR4- und CXCR7-immunzytochemisch gefärbten und WGA markierten Zellen verwendet, bei denen mit Hilfe von Corel Photo Paint eine Trennung der Kanäle in RGB (Red, Green, Blue) vorgenommen wurde. Der zyanblaue Kanal, der die Zellgrenze durch WGA markiert darstellt, wurde zur Erstellung einer Membran- und Zytosolmaske genutzt. Diese Masken wurden im Anschluss jeweils auf den grünen und den roten Kanal übertragen, die jeweiligen Inhalte kopiert und schwarz/weiß invertiert in neue Dateien überführt. Es zeigen sich nun schwarze Punkte auf weißem Grund für jede übertragene Maske. Diese Signale werden im Anschluss mit Hilfe einer dichtemessenden Software (PCBAS) quantifiziert und das Verhältnis der gemessenen Werte von Zytosol zu Membran bestimmt. Je größer der errechnete Wert, desto mehr Rezeptoren wurden innerhalb der Zelle detektiert.

3.2.3.3 Ermittlung der Apoptoserate

Dem Apoptose-Test liegt das Aussäen, Stimulieren, Färben und anschließende Zählen der apoptotischen Zellkerne zugrunde. Einen Tag vor der Stimulation wurden 50000 Zellen pro Deckglas auf PDL-beschichteten Deckgläsern ausgesät und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation erfolgte nach dem Spülen mit PBS + 0,5 % BSA in

DMEM + 0,2 % FKS.

Nach dem Ablauf der Stimulationszeit erfolgte die Fixierung der Zellen für 10 Minuten im Anschluss an drei Spülgänge mit einem 1:1 Acethon-Methanol-Gemisch.

Die Kernfärbung erfolgte für 35 Minuten mit DAPI und nach gründlichem Spülen wurden die Deckgläschen anschließend mit Immu-Mount auf Objektträgern eingedeckelt. Nach dem Aushärten bei 4 °C für 24 Stunden wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops sechs Bilder an unterschiedlichen Stellen aufgenommen und dann die apoptotischen Zellkerne markiert und ausgezählt. Dies erfolgte ohne Kenntnis des dazugehörigen Deckgläschens. Als Referenz wurde eine unbehandelte Kontrolle genutzt.

3.3 Statistik

Mittelwerte und Standardfehler werden angegeben. Die Signifikanz wurde über einen zweiseitigen, homoskedastischen Student'schen T-Test ermittelt und wie folgt kenntlich gemacht: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001.

4 Ergebnisse

Zunächst sollten für die geplanten Untersuchungen der Effekte der synthetischen CXCR4-Liganden geeignete Zelllinien ausgewählt werden. Das wichtigste Kriterium für diese Auswahl war, dass diese Zellen den Rezeptor CXCR4 exprimieren müssten, zudem wäre eine Expression des alternativen Rezeptors CXCR7 wünschenswert, sodass diese beiden Rezeptoren vergleichend untersucht werden können. Außerdem mussten die Kultivierungseigenschaften der Zellen die nachfolgenden Untersuchungen zu Internalisierung und Apoptose zulassen.

Aus einem vorhandenen Vorrat an Tumorzelllinien waren in der Arbeitsgruppe bereits Vorbefunde zur Expression von CXCR4 und CXCR7 in der Neuroblastomzelllinie SH-NSH und der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 vorhanden. Diese wurden zu Beginn dieser Arbeit zunächst mittels quantitativer RT-PCR verifiziert. Zusätzlich wurden die Expressionsdaten eines weiteren Rezeptors, CXCR3, der einen gemeinsamen Liganden mit CXCR7 besitzt sowie der natürlichen Liganden CXCL11 (bindet an CXCR3 und CXCR7) und CXCL12 (bindet an CXCR4 und CXCR7) erhoben, um in den weiteren Untersuchungen mögliche Interferenzen im Auge behalten zu können.

4.1 Expression von mRNA

Der quantitative Nachweis der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7, sowie der Liganden CXCL11 und CXCL12 an SK-NSH- und MCF-7-Zellen erfolgte zunächst durch Bestimmung der mRNA-Expression im Anschluss an das Umschreiben der mRNA in cDNA im Rahmen der quantitativen RT-PCR.

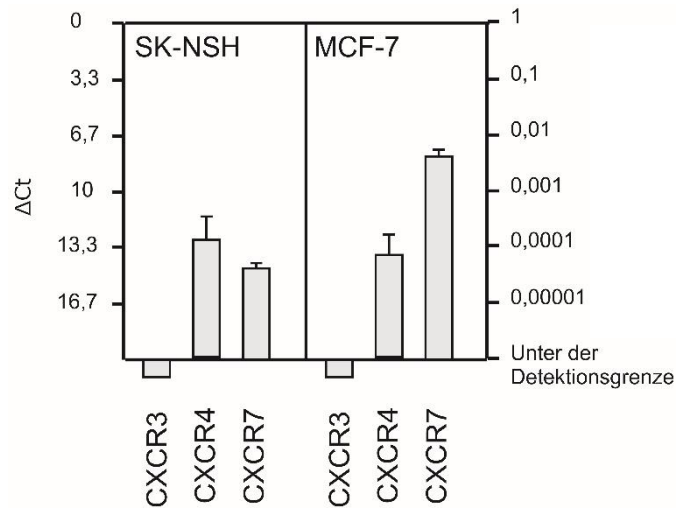


Abbildung 6: Nachweis von Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7

Dargestellt sind die ΔC_t -Mittelwerte und die daraus ermittelte relative Genexpression der Chemokinrezeptoren im Vergleich zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). CXCR3 wird bei beiden Zelllinien nicht detektiert. Eine Genexpression von CXCR4 und CXCR7 ist bei beiden Zelllinien vorhanden, wobei sich der Wert für CXCR4 bei den SK-NSH- und MCF-7-Zellen nur gering unterscheidet. CXCR7 weist bei MCF-7 eine wesentlich höhere Genexpression auf.

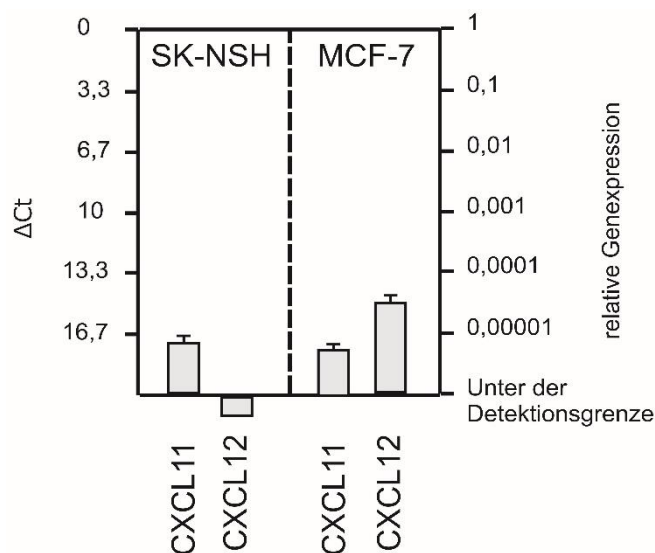


Abbildung 7: Nachweis der Liganden

In beiden Zelllinien wurde nach dem gleichen oben genannten Prinzip auch die Genexpression der Liganden ermittelt. Dabei zeigte sich, dass MCF-7 in sehr geringem Maße CXCL11 und 12 selbst exprimiert und SK-NSH nur CXCL11.

In den Abbildungen wird deutlich, dass die Mammakarzinomzelllinie MCF-7, sowohl den Rezeptor CXCR4 als auch den Rezeptor CXCR7 exprimiert, ebenso wie CXCL12 und in sehr geringem Maße CXCL11. Bei den SK-NSH-Zellen war kein CXCL12 nachweisbar und CXCR7 nur mit einer sehr geringen Expression. Bei beiden Tumorzelllinien wurden keine Anzeichen für den CXCL11-Rezeptor CXCR3 gefunden. Weiterhin wird deutlich, dass die Genexpression im Allgemeinen sehr niedrig ist, Ausnahmen bilden hier der Rezeptor CXCR7 in MCF-7 und CXCR4 in beiden Zelllinien.

4.2 Internalisierungsnachweise

4.2.1 Expression der Proteine

Da die qPCR nur RNA detektiert, bleibt weiterhin fraglich, ob die detektierten Proteine bei diesen geringen Expressionswerten auch tatsächlich exprimiert werden. Um die Expression der Rezeptoren auf Proteinebene zu bestätigen, wurde die indirekte Immunzytochemie an lebenden Zellen verwendet. Diese Art Detektion zeigt die Lokalisation der Rezeptoren auf der Zelloberfläche an. Die Färbungen wurden gegen die extrazellulären Domänen der Rezeptoren durchgeführt.

Die Zellen wurden auf PDL-beschichteten Deckgläschen einer (MCF-7) bzw. zwei Tage (SK-NSH) kultiviert und anschließend, wie bereits oben (Kapitel Immunzytochemische Färbung) beschrieben, gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit 63x Vergrößerung und gleichbleibender Belichtungszeit am Fluoreszenzmikroskop Axiovert unter Verwendung eines Apotoms.

4.2.2 Vorversuche zur Lebendfärbung und Internalisierungszeiten

Die immunzytochemische Fluoreszenzfärbung an unfixierten Zellen eignet sich gut für das Nachvollziehen von Internalisierungsprozessen.

Zur Visualisierung dieses Vorganges wurden die Oberflächenproteine wie bereits beschrieben angefärbt. Die Stimulation mit den natürlichen Liganden CXCL11 und CXCL12 diente als Vergleich der zu beobachtenden Internalisierung der synthetischen Liganden. In Vorversuchen wurden Internalisierungszeiten von fünf, acht und zehn Minuten verglichen. Letztere wurde für alle Versuche verwendet, welche hier gezeigt und ausgewertet werden, da sie den stattfindenden Prozess der Internalisierung am besten verdeutlicht. Bei zehn Minuten kann der Rezeptor in der gesamten Zelle detektiert werden, sowohl bei der Mamma- als auch bei der Neuroblastomzelllinie.

Von den beiden untersuchten Rezeptoren konnte nur CXCR4 auf Proteinebene durch Färbung in SK-NSH-Zellen nachgewiesen werden, nicht so CXCR7. Bei den MCF-7-Zellen konnte hingegen die Expression beider Rezeptoren auf Proteinebene nachgewiesen werden.

4.2.3 Internalisierung von CXCR4 und CXCR7

Internalisierung von CXCR4 und CXCR7 durch natürliche Liganden an SK-NSH-Zellen

Abbildung 8 zeigt die Internalisierung an SK-NSH-Zellen, die nur CXCR4 exprimieren, welches mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde. An der ruhenden Zelle (4°C) und der unstimulierten Zelle waren deutlich die mittels WGA (wheat germ agglutinin) angefärbten Zelloberflächen zu erkennen. WGA ist ein wasserlösliches Lektin, das spezifische Interaktionen mit Zuckerstrukturen der Zellmembran eingeht und dementsprechend bei Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen die Zellmembran darstellt. Der Chemokinrezeptor war ohne Stimulus immer an der Zelloberfläche lokalisiert. Bei Stimulation mit CXCL12 war nach 10 Minuten eine Internalisierung der Rezeptoren zu beobachten, wohingegen durch CXCL11 keine Internalisierung erfolgte und die Ergebnisse den unstimulierten Zellen gleichen. Eine unspezifische Färbung durch den Sekundärantikörper konnte durch die Kontrollen ausgeschlossen werden, da sich bei diesen nur die durch DAPI gefärbten Zellkerne und keine Zellränder zeigten.

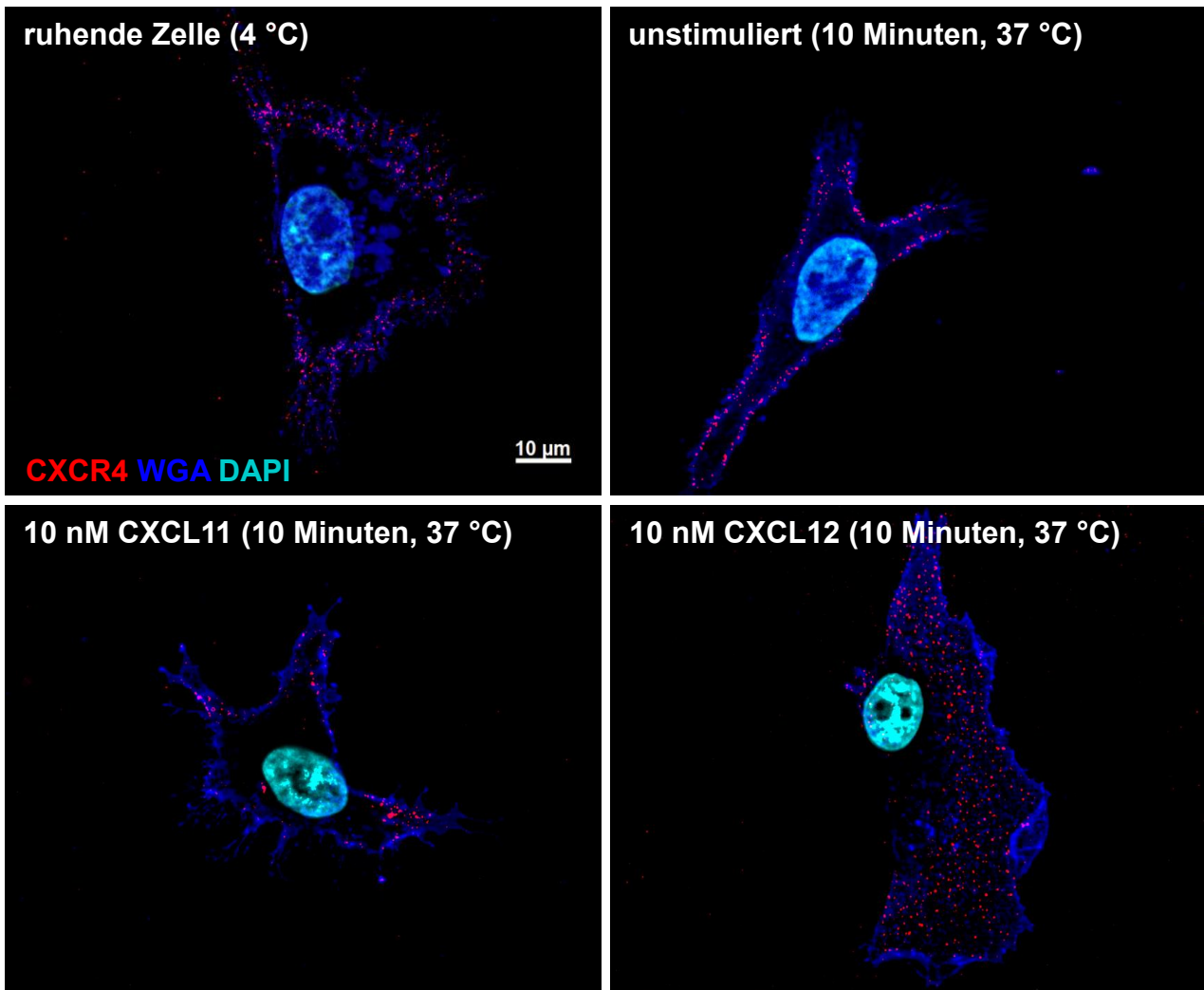


Abbildung 8: Internalisierung natürlicher Liganden (unten) im Vergleich zu ruhenden (oben links) bzw. nicht stimulierten Zellen (oben rechts) an SK-NSH-Zellen

Zur Visualisierung der Zellgrenzen wurde WGA- Alexa 647 (Wheat germ agglutinin- hier blau) genutzt. Sowohl bei der ruhenden Zelle, als auch bei der unstimulierten Kontrolle zeigt sich eine Verteilung der Rezeptoren auf der mit WGA markierten Zellgrenze. Nach 10 Minuten zeigt sich auf dem mit CXCL11 behandelten Deckgläschen immer noch eine Anreicherung an der Zelloberfläche. Auf der Abbildung unten rechts ist jedoch zu sehen, dass es zu einer deutlichen Internalisierung nach Stimulation mit CXCL12 kommt.

Internalisierung von CXCR4 und CXCR7 durch natürliche Liganden an MCF-7 Zellen

Die Stimulation der MCF-7-Zellen erfolgte ebenfalls mit CXCL11 und CXCL12 zur Darstellung der Internalisierung. Die ruhenden und unstimulierten Zellen wiesen CXCR4 und CXCR7 an der Zelloberfläche auf. Sowohl bei der Stimulation mit CXCL11 als auch mit CXCL12 zeigt sich eine Internalisierung beider Rezeptoren.

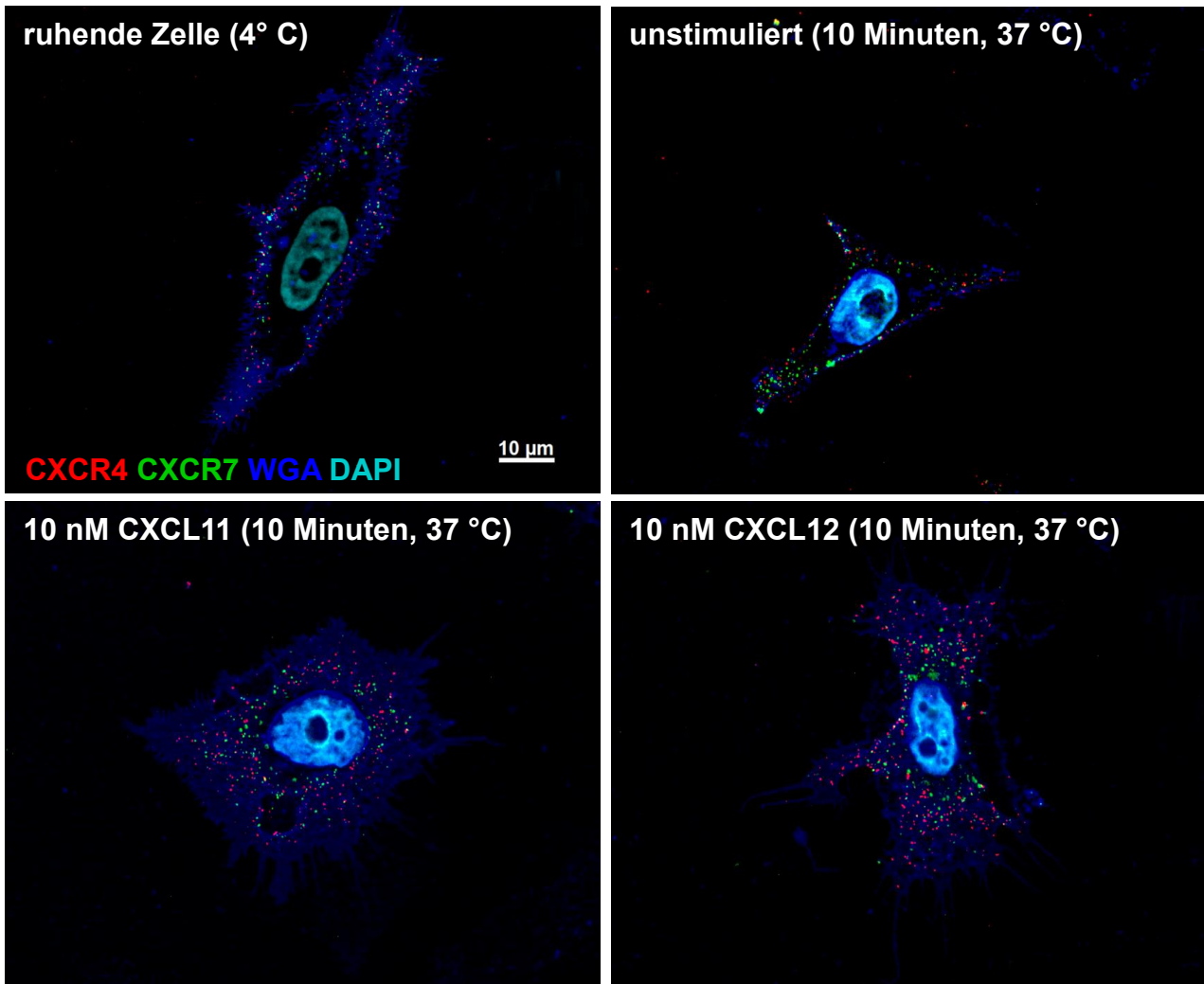


Abbildung 9: Internalisierung natürlicher Liganden (unten) im Vergleich zu ruhenden (oben links) bzw. nicht stimulierten Zellen (oben rechts) an MCF-7-Zellen

Bei beiden natürlichen Liganden ist eine Internalisierung der Rezeptoren CXCR4(rot) und CXCR7(grün) erkennbar. Die Zellkerne (DAPI) zeigen sich deutlich in cyan. Während auf den Abbildungen der ruhenden bzw. unstimulierten Zellen beide Rezeptoren einzeln erkennbar entlang der markierten Zellgrenzen liegen, zeigt sich sowohl bei der Stimulation mit CXCL11 als auch mit CXCL12 eine gemeinsame Internalisierung beider Rezeptoren. Zu beachten ist hier vor allem, dass es nach Internalisierung mit CXCL11 ebenfalls zu einer Internalisierung von CXCR4 kommt, obwohl die beiden keine Bindungspartner sind.

Ein „Merging“, das bedeutet eine Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzsignale, war trotz der hohen Dichte an angefärbten Rezeptoren nicht zu erkennen. Unter Stimulation mit dem mit beiden Rezeptoren agierenden Liganden CXCL12 zeigte sich, dass sowohl CXCR4 als auch CXCR7 internalisiert wurden und an wenigen Punkten sogar ein „Merging“ zu sehen ist. Unter Stimulation mit CXCL11 kommt es ebenfalls zu einer gemeinsamen Rezeptorinternalisierung. Beachtlich ist hier, dass auch CXCR4 internalisiert wird, da CXCL11 nur für CXCR7 Bindungspartner ist.

Eine unspezifische Färbung durch den Sekundärantikörper konnte auch hier durch die Kontrollen ausgeschlossen werden, da sich nur die durch DAPI gefärbten Zellkerne und keine Zellränder zeigten.

Internalisierung von CXCR4 und CXCR7 durch synthetische Liganden an SK-NSH- Zellen

Die Internalisierung erfolgte wie mit den natürlichen Liganden für 10 Minuten bei 37°C. Bei HexGua und FC131 war eine vollständige Internalisierung des Rezeptors CXCR4 ohne membranständige, nicht-internalisierte Rezeptoren erkennbar (s. Abb. 10). Ga-CPCR4-2 und Phe-5-AcTZ lösten ebenfalls eine Internalisierung aus. Ein Unterschied in der Verteilung der Rezeptoren ist hier noch nicht erkennbar.

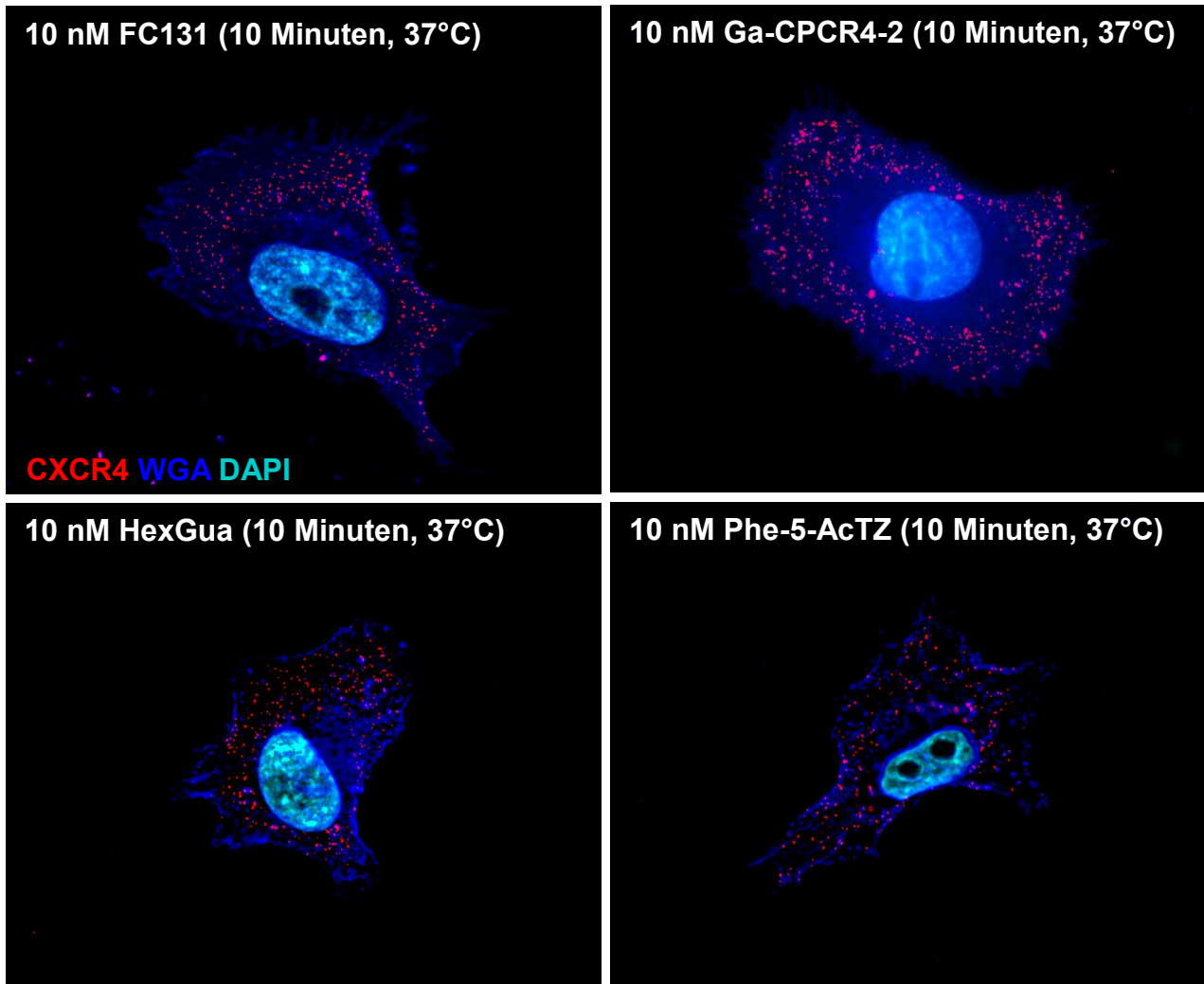


Abbildung 10: Internalisierung synthetischer Liganden an SK-NSH-Zellen

Nach Zugabe aller vier Liganden ist eine Internalisierung von CXCR4 (rot) wahrnehmbar. Der Zellkern ist in cyan dargestellt, die Zellgrenzen werden durch WGA-647 in blau sichtbar. Die Internalisierung des Rezeptors zeigt sich bei Zugabe aller synthetischen Liganden nach ca. 10 Minuten in gleichem Maße.

Internalisierung von CXCR4 und CXCR7 durch synthetische Liganden an MCF-7 Zellen

Durch die Expression von CXCR4 und CXCR7 auf MCF-7-Zellen sollte nun die untersucht werden, ob diese auch beim CXCR7 zu einer Internalisierung führen. Durch die Markierung der Zellgrenzen mit WGA-647 wird deutlich, dass beide Rezeptoren internalisiert werden.

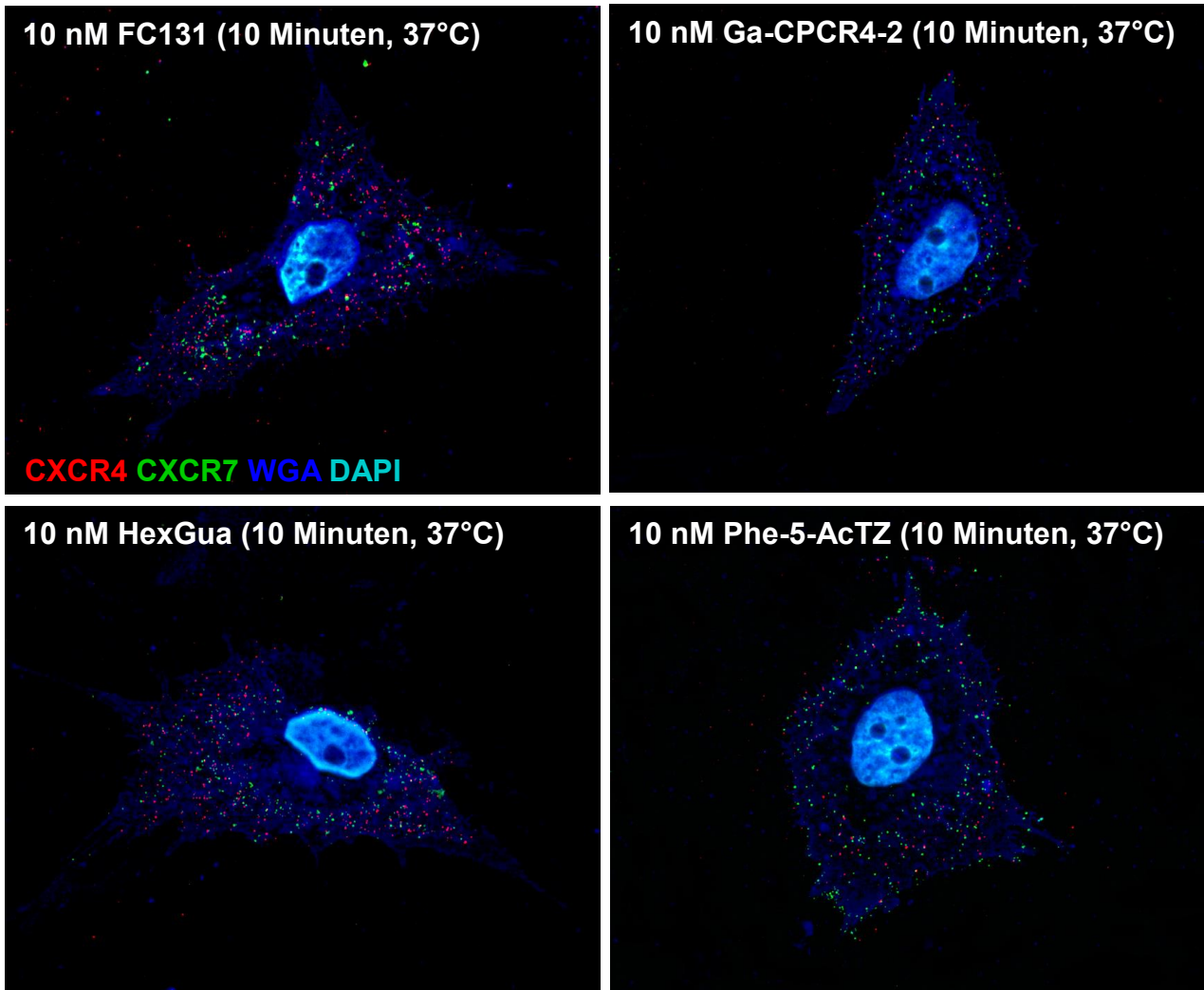


Abbildung 11: Internalisierung synthetischer Liganden an MCF-7 Zellen

Nach Zugabe aller vier Liganden ist eine Internalisierung zu beobachten. Sowohl CXCR4 (rot), als auch CXCR7 (grün) sind im Innern der Zellgrenze WGA-647 (blau) und näher am cyan-gefärbten Nucleus vorzufinden.

Bei allen vier Liganden ist eine Internalisierung der Rezeptoren sichtbar, ähnlich wie bei den natürlichen Liganden, denn auch hier wird CXCR7 co-internalisiert, obwohl die synth. Liganden spezifisch an CXCR4 binden.

4.2.4 Quantifizierung der Internalisierung bei SK-NSH

Da wir das Signal quantifizieren wollten, wurden die Aufnahmen der Rezeptorinternalisierung objektiv quantifiziert.

		Ratio	± SD
Control			
	CXCR4	0,30	0,15
Control 37°C 10 min			
	CXCR4	0,16	0,08
CXCL 11			
	CXCR4	0,64	0,16
CXCL 12			
	CXCR4	1,77	0,67
FC 131			
	CXCR4	4,24	2,52
Ga-CPCR4-2			
	CXCR4	1,86	0,44
HexGua			
	CXCR4	7,69	3,64
Phe-5-ActZ			
	CXCR4	3,04	0,54

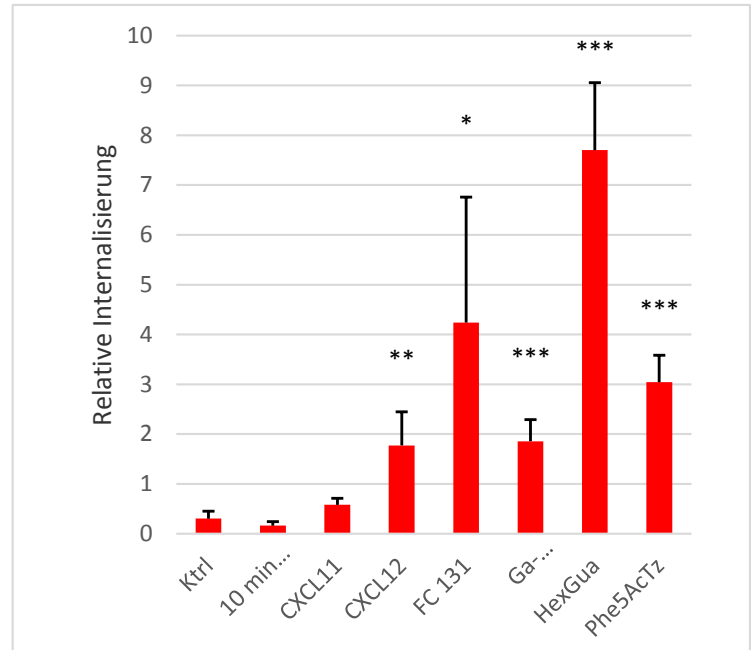


Abbildung 12: Quantifizierung der Internalisierung der SK-NSH-Zellen und graphische Darstellung der relativen Werte

Es wird deutlich, dass vor allem die mit den synthetischen Liganden Ga-CPCR4, HexGua und Phe-5-ActZ inkubierten SK-NSH-Zellen eine stark signifikante Internalisierung aufweisen. Mit absteigender Signifikanz folgen die natürlichen Liganden CXCL12, CXCL11 und der synthetische Ligand FC131. n = 5

Die digitalen Fotografien der immunzytochemisch gefärbten und mit WGA markierten Zellen wurden mit Hilfe von Corel Photo Paint in RGB Kanäle (Red, Green, Blue) getrennt. Der blaue Kanal, der die Zellgrenze durch WGA markiert darstellt, wurde zur Erstellung einer Membran- und Zytosolmaske genutzt. Diese Masken wurden im Anschluss jeweils auf den grünen und den roten Kanal übertragen, die jeweiligen Inhalte kopiert und schwarz/weiß invertiert in neue Dateien überführt. Es zeigten sich schwarze Punkte auf weißem Grund für jede übertragene Maske. Diese Signale wurden im Anschluss mit Hilfe einer Densitometrie-Software (PCBAS) quantifiziert und das Verhältnis der gemessenen Werte von Zytosol zu Membran bestimmt. Je größer der errechnete Wert, desto mehr Rezeptoren wurden innerhalb der Zelle detektiert [Hattermann et al., 2014].

Bei der Neuroblastomzelllinie fällt eine deutlich stärkere Internalisierung für die synthetischen Liganden auf, besonders bei HexGua. Die Werte unter „ratio“ stellen hierbei die durchschnittliche relative Internalisierung und die Werte unter „SD“ die jeweilige

Standardabweichung dar. So wird deutlich, dass HexGua mit 7,69 zwar den größten Durchschnittswert, mit 3,64 aber auch die höchste Standardabweichung liefert. FC131 verzeichnet bei einer durchschnittlichen Internalisierung von 4,24 ebenfalls eine hohe Standardabweichung von 2,52. Die relative Internalisierung von Phe-5-AcTZ sieht hingegen aufgrund der geringen Standardabweichung von 0,54 bei einem Durchschnittswert von 3,04 konstant aus. Ga-CPCR4 weist ähnliche Ergebnisse wie CXCL12 auf und CXCL11 verzeichnet die geringste relative Internalisierung bei einem Wert von 0,64 ($\pm 0,16$), da dieser kein Ligand ist. Im Vergleich zur Kontrolle wiesen HexGua, Phe-5-AcTZ und Ga-CPCR4, trotz teilweise hoher Standardabweichung, die größten statistisch nachweisbaren Signifikanzen auf, gefolgt von CXCL12, FC 131 und CXCL11.

4.2.5 Quantifizierung der Internalisierung bei MCF-7

Die optisch beschriebenen Ergebnisse der Rezeptorfärbungen und Internalisierungen wurden für MCF-7 ebenfalls quantitativ ausgewertet, um eine verlässliche Aussage bezüglich des Eindrucks einer hohen Internalisierung mit FC131 zu treffen. In Abbildung 11 wird deutlich, dass bei den MCF-7-Zellen beide Rezeptoren für FC131, HexGua und Phe-5-AcTZ eine statistisch signifikante Internalisierung zeigen. Sowohl CXCR4 als auch CXCR7 internalisieren durch CXCL11 und 12 sowie die synthetischen Liganden, jedoch zeigt der CXCR4-Rezeptor bei allen Liganden, bis auf HexGua, mit Werten von 3,71 ($\pm 2,09$) für den Rezeptor CXCR4 und 3,38 ($\pm 1,71$) für den Rezeptor CXCR7 eine größere Internalisierung. Ga-CPCR-4 zeigt mit 1,26 ($\pm 0,87$) für den Rezeptor CXCR4 und 2,33 ($\pm 1,41$) für den Rezeptor CXCR7 bei den Mammakarzinomzellen die geringste Internalisierung im Vergleich zu den anderen Rezeptoren.

		Ratio	± SD
Control	CXCR7	0,80	0,69
	CXCR4	0,75	0,41
Control 37°C 10 min	CXCR7	0,91	0,55
	CXCR4	0,98	0,68
CXCL11	CXCR7	1,90	0,84
	CXCR4	1,51	0,79
CXCL12	CXCR7	3,12	2,15
	CXCR4	1,82	1,30
FC 131	CXCR7	3,93	2,32
	CXCR4	3,21	1,62
Ga-CPCR4-2	CXCR7	2,33	1,41
	CXCR4	1,26	0,87
HexGua	CXCR7	3,38	1,71
	CXCR4	3,71	2,09
Phe-5-AcTZ	CXCR7	3,09	1,93
	CXCR4	2,57	1,34

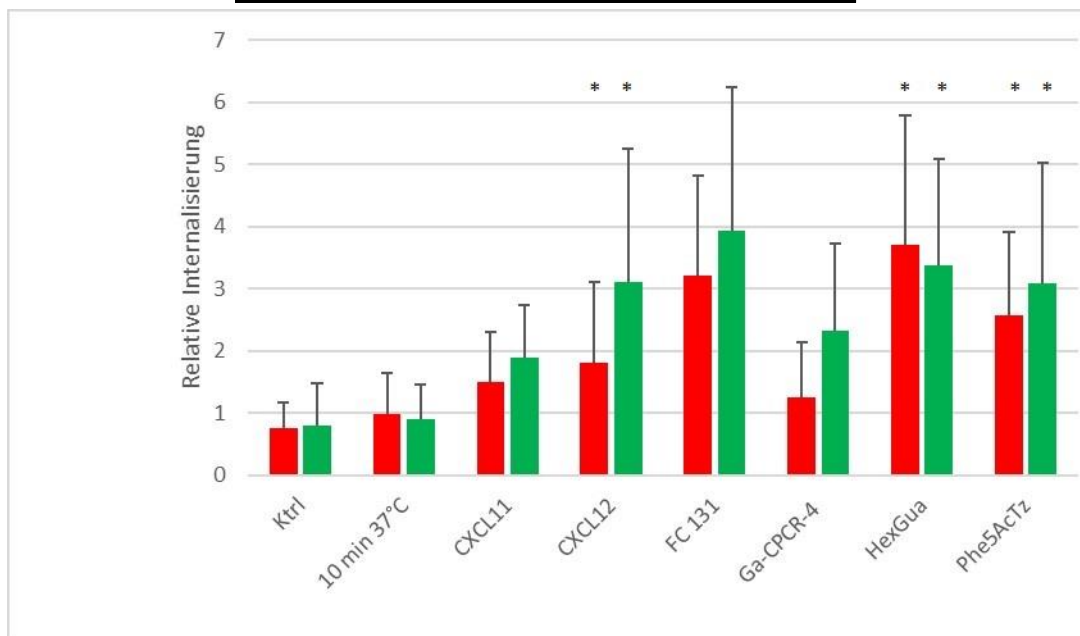


Abbildung 13: Quantifizierung der Internalisierung der MCF-7-Zellen mit graphischer Auswertung der Ergebnisse

Es wird deutlich, dass bei den MCF-7-Zellen beide Rezeptoren für FC131, HexGua und Phe-5-AcTZ eine geringe Signifikanz der Internalisierung zeigen. Sowohl CXCR4 als auch CXCR7 internalisieren durch CXCL11 und 12 sowie die synthetischen Liganden, jedoch zeigt der CXCR4-Rezeptor bei allen Liganden bis auf HexGua eine größere Internalisierung. Ga-CPCR-4 zeigt bei den Mammakarzinomzellen die geringste Internalisierung im Vergleich zu den anderen Rezeptoren. Im Vergleich zu beiden Kontrollwerten zeigt sich jedoch sowohl bei den natürlichen als auch bei den synthetischen Liganden eine stärkere Internalisierung. Die Werte „ratio“ stellen die durchschnittliche relative Internalisierung und die Werte unter „SD“ die jeweilige Standardabweichung dar. n = 5

4.3 Untersuchungen der Apoptoserate

Bei Vorversuchen wurden verschiedene zelltoxische Substanzen untersucht, um eine geeignete Konzentration und Stimulationszeit für eine stabile Apoptoserate zu ermitteln. Nachdem bei MCF-7-Zellen bereits Versuche mit Staurosporin beschrieben wurden, die eine stete Apoptoserate ergaben, wurde dieser Proteinkinase-C-Inhibitor für die Mammakarzinomzelllinie verwendet. Zur Bestimmung einer idealen Substanz für eine stabile Apoptoserate bei den SK-NSH-Zellen wurden mit Staurosporin, Camptothecin und Temozolomid mehrere Zeit- und Konzentrationsreihen durchgeführt.

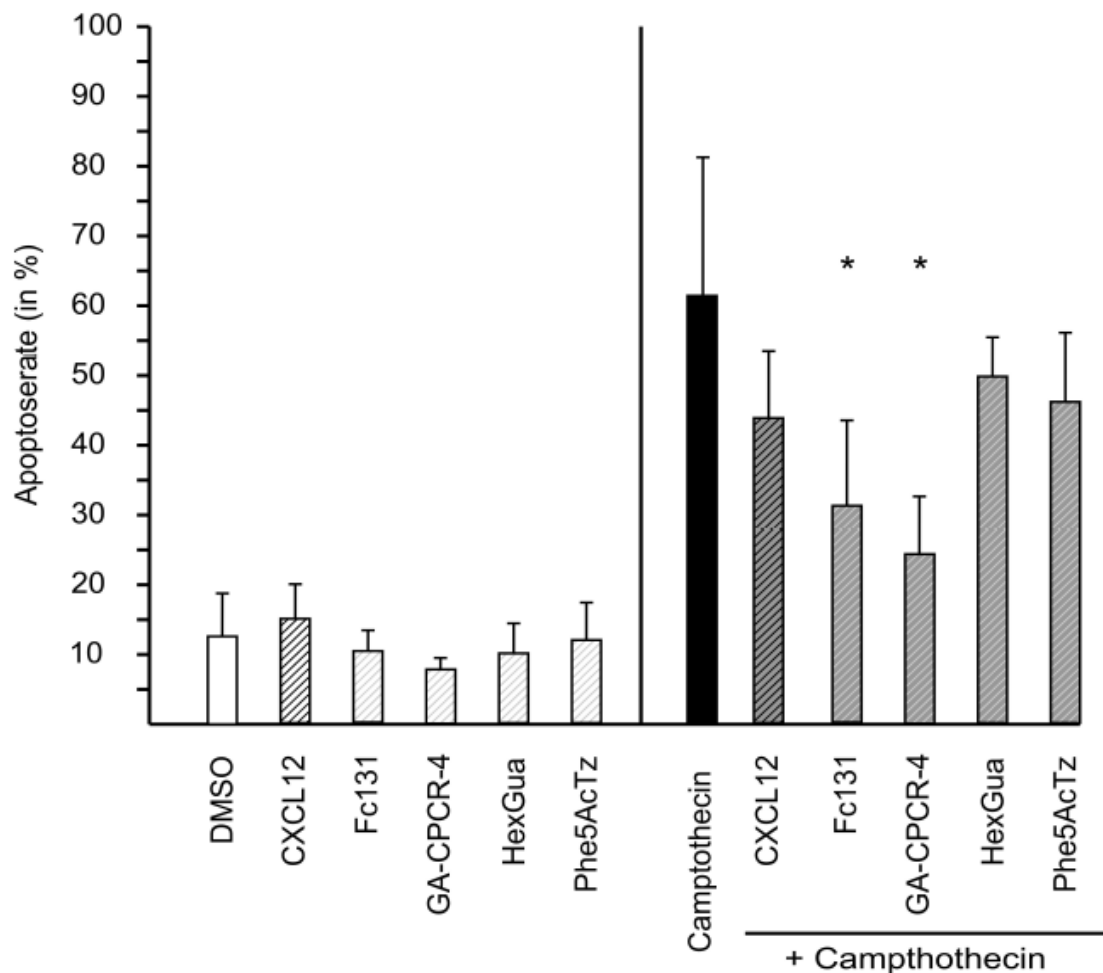


Abbildung 14: Apoptoserate der SK-NSH-Zellen

Auf der linken Seite sieht man die Apoptoserate aller Liganden im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO nach einer Stimulierung über 24 Stunden. Auf der rechten Seite wurden die Zellen unter permanenter Anwesenheit der Liganden und Camptothecin stimuliert. Alle verwendeten natürlichen und synthetischen Liganden sind nicht pro-apoptotisch. CXCL12 und die synthetischen Liganden sind tendenziell anti-apoptotisch, signifikant vor allem für FC131 und Ga-CPCR-4. Die Signifikanz bezieht sich auf die Camptothecin-Kontrolle. n = 5-6

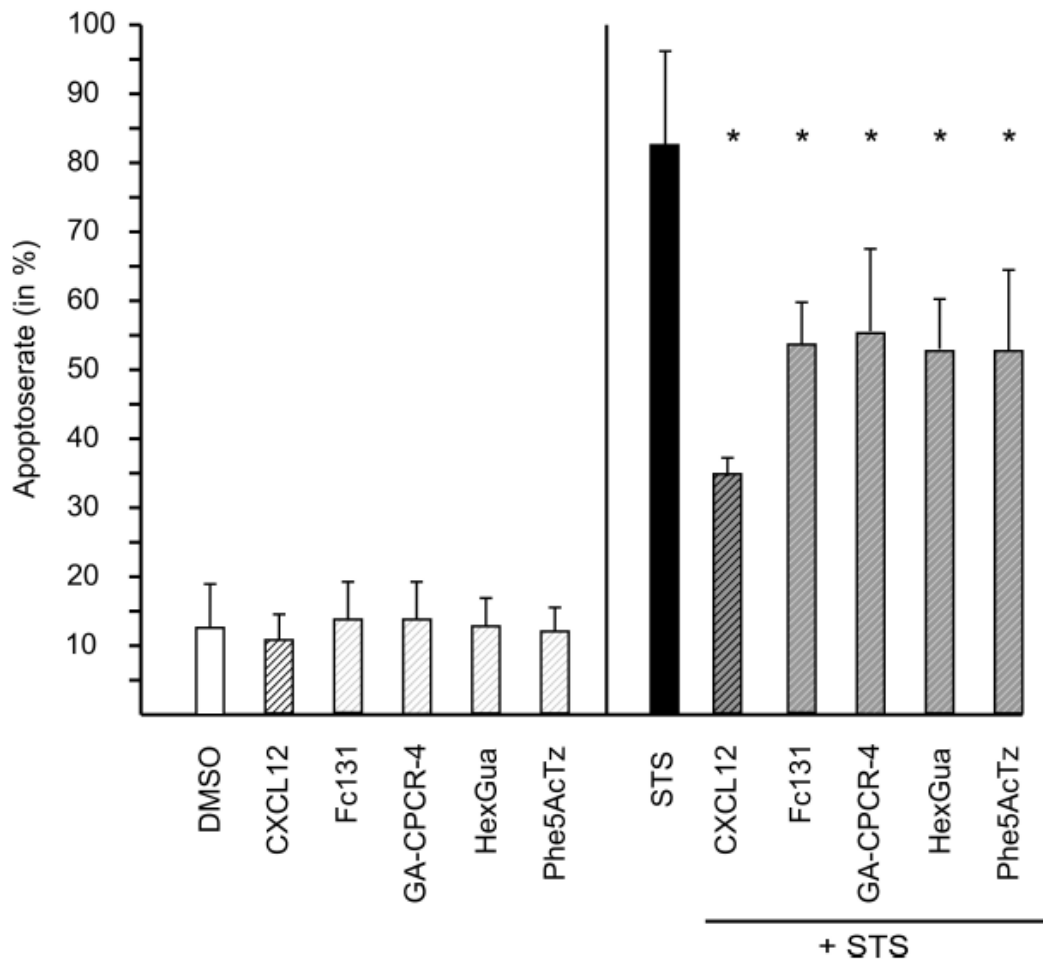


Abbildung 15: Apoptoserate der MCF-7-Zellen

Auf der linken Seite befinden sich die Apoptoseraten der Zellen nach einer Stimulierung durch die Liganden und die Kontrolle mit DMSO. Rechts wurde die zelltoxische Substanz Staurosporin hinzugefügt. Die Signifikanzen wurden in Bezug auf die Staurosporin-Kontrolle ermittelt. Alle Liganden sind nicht pro-apoptotisch. CXCL12 ist relativ stark anti-apoptotisch, während die synthetischen Liganden etwas weniger anti-apoptotisch wirken. n = 5-6

Die Apoptoserate wurde hierbei mit Hilfe des Verhältnisses von apoptotischen Zellkernen, bezogen auf die Gesamtzahl der Zellkerne, ermittelt. Bei einer Stimulationszeit von 24 Stunden erwies sich das Alkaloid Camptothecin bei einer Konzentration von 30 μ M als am besten geeignet.

Bei SK-NSH liegt die Grundapoptoserate der reinen Liganden zwischen 8,1 und 14,8 %. Unter Zugabe von Camptothecin stieg die Rate nach 24 Stunden auf 61,6 % (\pm 19,6) an. Die Kombination Camptothecin und FC131 senkte diese auf 31,6 % (\pm 12,1). Ga-CPCR4-2 führte zu einer noch stärkeren Verminderung auf 24,4 % (\pm 8,1). Die anderen verwendeten Liganden HexGua und Phe-5-AcTZ sowie der natürliche Ligand CXCL12 verminderten die Apoptoserate zwar ebenfalls, konnten jedoch mit 44,4 bis 49,7 % weniger signifikante Ergebnisse vorweisen, als die Erstgenannten.

Durch Staurosporin konnte die Apoptoserate bei den MCF-7-Zellen auf 83,0 % (\pm 13,6)

festgelegt werden. CXCL12 reduzierte diesen Wert signifikant auf 29,6 % ($\pm 2,7$). Die synthetischen Liganden führten alle zu Ergebnissen zwischen 53,3 % und 54,9 %.

Es wird deutlich sich, dass sowohl die natürlichen als auch die synthetischen Liganden die Apoptose inhibieren. Dabei zeigt sich im Falle von SK-NSH, dass die beiden synthetischen Liganden FC131 und Ga-CPCR4-2 einen deutlich höheren Einfluss auf die Senkung der Apoptoserate haben, als HexGua, Phe-5-ActZ oder der natürliche Ligand CXCL12. Ein anderes Bild ergibt sich bei den MCF-7-Zellen. Es führen zwar alle Liganden zu einer Senkung der Apoptoserate, jedoch ist die Wirkung des natürlichen Liganden hierbei wesentlich stärker.

5 Diskussion

Chemokine und -rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle bei Proliferation, Metastasierung und Apoptose von Tumoren, aber auch in physiologischen Wachstums- und Umbauprozessen. Gerade CXCR4 mit dem Liganden CXCL12 ist ein gut untersuchter und in seiner Bedeutung und Verbreitung prominenter Vertreter dieser Rezeptoren. CXCL12 ist jedoch ebenfalls Bindungspartner eines „jüngeren“ Chemokinrezeptors. Der erst 2006 von Burns et al. beschriebene CXCR7 mit seinem Liganden CXCL11 gewann in den letzten Jahren ebenfalls an Bedeutung, da die anfängliche Annahme er sei nur ein *Decoy*-Rezeptor, was bedeutet, dass er außer einer reinen Ligandenbindung ohne weitere intrazelluläre Signalwege keinen Effekt hat, falsch ist. Beide Rezeptoren treten auf Zellen, auf denen sie gemeinsam exprimiert werden, teilweise als Heterodimere auf [Levoye et al., 2009; Hattermann et al., 2014]. In der klinischen Anwendung wird CXCR4 zum Beispiel durch AMD3100 in der HIV-Therapie gehemmt [Flomenberg et al., 2005] und zur Freisetzung von Stammzellen aus dem Knochenmark genutzt. Die klinische Relevanz der Chemokine ist dementsprechend gegeben. Sie sind Angriffspunkt von Medikamenten und Gegenstand der biochemisch-pharmazeutischen Forschung.

Die Arbeitsgruppe der Nuklearmedizin der Technischen Universität München um Prof. Wester entwickelte detektionsfähige Liganden für Chemokinrezeptoren. Die für die Rezeptoren CXCR4 als spezifisch beschriebenen vier synthetischen Liganden [Demmer et al., 2011] HexGua, FC131, Phe-5-AcTZ und Ga-CPCR4-2 wurden in dieser Arbeit gegenüber den natürlichen Liganden getestet, um Hinweise auf die zellbiologische Wirkung der synthetischen Liganden zu gewinnen. Dabei wurde insbesondere die Internalisierung der Rezeptoren untersucht, die die Detektierbarkeit der synthetischen Liganden verbessern würde und eine Desensitivierung der Zellen gegenüber weiteren Liganden bewirken würde. Zur Überprüfung der biologischen Effekte der Liganden wurde die Rettung vor chemisch induzierter Apoptose exemplarisch gewählt.

5.1 Internalisierung der synthetischen Liganden

Mithilfe der immunzytochemischen Untersuchung und einer quantifizierten Auswertung konnte gezeigt werden, dass sich bei CXCR4- und CXCR7-exprimierenden Zellen durch die synthetischen Liganden eine Internalisierung auslösen ließ.

Je nach Ligand war diese ähnlich ausgeprägt wie unter Stimulation mit den natürlichen

Liganden CXCL11 und CXCL12. HexGua und FC131 zeigten die stärksten Internalisierungsraten.

Aufgrund der Rezeptorbindung, verbunden mit einer ausgeprägten Internalisierung der Liganden, ist als ein Nebeneffekt erkennbar, dass die extrazelluläre Verweildauer der Stimuli gesenkt wurde. Dieser Effekt wurde ursprünglich den *Decoy*-Rezeptoren zugeschrieben [Re et al., 1994], da aufgrund der Bindung die extrazelluläre Ligandenkonzentration herabgesenkt und somit die signalübertragenden Effekte der Stimuli modifiziert bzw. inhibiert werden. Derselbe Effekt tritt mit den synthetischen Liganden bei der Internalisierung ebenfalls auf, wobei die Erhöhung der intrazellulären Verweildauer sich hier als das entscheidendere Merkmal darstellt, da es zu einer verbesserten Signalstärke führt. Es ist erkennbar, dass nicht nur CXCR4, sondern auch CXCR7 internalisiert wird. Eine Heterodimerisierung wurde für beide Rezeptoren bereits beschrieben [Luker et al., 2009]. Da jedoch kein deutliches „Merging“, das bedeutet eine Überlagerung der „rot“ markierten CXCR4 und „grün“ markierten CXCR7 Rezeptoren, zu sehen war, konnte dieser Effekt durch unsere vorliegenden Untersuchungen weder bestätigt noch widerlegt werden. Allerdings konnten wir zeigen, dass eine gemeinsame Internalisierung stattfindet. Das bedeutet, dass auch die Oberflächenexpression von CXCR4 ohne spezifische Ligandenbindung des Rezeptors durch einen spezifischen Liganden für CXCR7, wie zum Beispiel CXCL11, reguliert werden kann.

5.2 Einsatz der Liganden in der therapeutischen Diagnostik

Die Effekte von Liganden auf Chemokinrezeptoren können variieren. Ein Einsatz als Marker und Detektor von Tumorzellen sollte nicht mit einer Schädigung des Patienten einhergehen. Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist der für den Körper effektivste Weg, insuffizient arbeitende Zellen zu entsorgen. Da es vor allem unter Einfluss zytotoxischer Substanzen wie Camptothecin oder Staurosporin zur Verringerung der Apoptoserate kommt [Chae et al., 2000], sollte überprüft werden, ob die Regulation der Apoptose über Liganden aktiviertes CXCR7 beeinflussbar sein könnte. Wenn der synthetische Ligand, den man für die Diagnostik verwendet, gleichzeitig Zelltod bewirkt, bzw. die antiapoptotische Wirkung von CXCL12 und CXCL11 inhibiert, wäre dies positiv, da damit eine Möglichkeit zu einer schonenden und effektiven Krebstherapie bestünde.

Zur Überprüfung der biologischen Effekte der Liganden, wurde deshalb exemplarisch die Rettung vor chemisch induzierter Apoptose gewählt. Die natürlichen Liganden CXCL11 und CXCL12 beeinflussen vor allem über den Chemokinrezeptor CXCR7 die Tumorzellen anti-

apoptotisch [Hattermann et al., 2010]. Vergleichbar mit den Erwartungen sind die synthetischen Liganden teilweise in der Lage, die Apoptose in einer ähnlichen Weise, wie die natürlichen Liganden CXCL11 und CXCL12 zu steuern. Die beobachteten Effekte der synthetischen Liganden sprechen also für eine agonistische, das bedeutet ebenfalls anti-apoptotische Wirkung. Wünschenswert wäre bei einem diagnostischen Einsatz gleichzeitig ein therapeutischer Nutzen, also eher eine Inhibition der anti-apoptotischen Wirkung.

Die Kombination aus meist bildgebenden Diagnoseverfahren bei gleichzeitiger therapeutischer Eingriffsmöglichkeit ist aktuell Gegenstand der Forschung für verschiedene Krankheitsbilder. Die am ehesten als „Theranostik“ zu bezeichnenden Verfahren stützen sich dabei auf das Konzept der photodynamischen Therapie [Rai et al., 2010]. Die Grundidee dieses Konzeptes basiert auf einem Photosensitizer, das heißt einer lichtaktivierbaren, chemischen Substanz, welche an bestimmte Zellstrukturen andockt bzw. über Endozytosemechanismen in die Zelle eindringt. Mithilfe von fluoreszenzbasierten Diagnoseverfahren ist nun eine Diagnose der „schadhaften“ Zellen möglich und es kommt durch Lichtaktivierung zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen [Celli et al., 2010]. Diese zytotoxische Reaktion führt letztendlich zum Zelltod.

Klinisch angewendet wird die antimikrobielle, photodynamische Therapie zum Beispiel bei akuter und chronischer Parodontitis. Bei dieser Erkrankung führt ein bakterieller Biofilm auf der Zahnwurzeloberfläche über die Bildung von pathogenen Toxinen zu einer Entzündung des umliegenden Zahnhalteapparates (Parodont) langfristig zum Knochenabbau und schließlich zum Zahnverlust [Chen, 2001]. Die Therapie konzentriert sich auf die Entfernung des parodontalpathogenen Biofilms. Dazu stehen eine Vielzahl an Instrumenten wie hand- und luftgetriebene Scaler und Küretten sowie Pulverstrahlgeräte und Lasersysteme zur Verfügung [Schwarz et al., 2008]. Gemein haben sie, wie in Abbildung 16 zu sehen, dass schwierige Stellen wie enge Furkationsbereiche oder starke Wurzelkonkavitäten nur ineffizient gereinigt werden können [De Almeida et al., 2008].

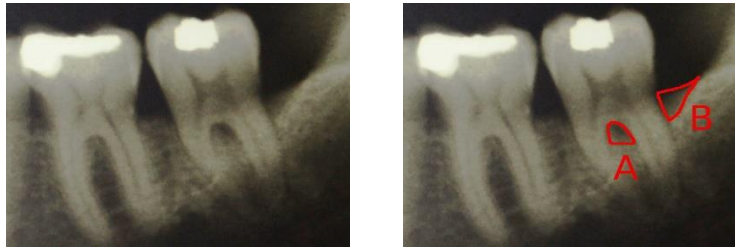


Abbildung 16: Röntgenbild des Zahnes 37 bei chronischer Parodontitis als Einsatzgebiet der photodynamischen Therapie

Der dargestellte Furkationsbefall (A) und die distale Knochentasche (B) stellen schwierige Engstellen bei der klassischen Entfernung des Biofilms mit Handinstrumenten dar. Abbildung des Patientenfalles mit freundlicher Genehmigung von Dr. E. Holzenburg.

Als Verfahren, um diese Engstellen ebenfalls zu reinigen, ist die Anwendung der Kombination eines Diodenlasers mit Methylenblau geeignet. Die Aktivierung des Methylenblaus und damit Elimination der Bakterien führt nach derzeitiger, nur auf unzureichend randomisiert kontrollierten Studien beruhenden Datenlage, zu ähnlichen Ergebnissen wie die Anwendung von Handinstrumenten [Polansky et al., 2009] und ist deshalb nicht im „Einheitlichen Bewertungsmaßstab für zahnärztliche Leistungen“ (Stand 2012) erfasst. Da dieses Verfahren den oben genannten Prinzipien weitestgehend folgt, aber keine Diagnostik beinhaltet, ist hier nicht von „Theranostik“ zu sprechen.

Als „Theranostikum“ im engeren Sinne ist der Wirkstoff Verteporfin im Medikament Visudyne® (Fa. Novartis Pharma GmbH) zu bezeichnen. Die Indikation des Medikaments ist die feuchte Form der altersbedingten Makuladegeneration, bei der es unterhalb der Retina zu Neovaskularisationen mit Flüssigkeitsaustritt kommt. Dies führt zu Vernarbungen, einer Einschränkung des Sehvermögens und schlussendlich zur Erblindung [Kent et al., 2014]. Visudyne wird therapeutisch intravenös appliziert und reichert sich in den Neovaskularisationen an. Die Darstellung der Gefäßverläufe erfolgt über Fluoreszenzangiographie und bei Aktivierung mit einem nicht-thermischen roten Diodenlaser kommt es zu einem Verschluss der Blutgefäße [Mc Bride et al., 2010].

Diese Form der „Theranostik“ ist mit den gewonnenen Ergebnissen der untersuchten Liganden primär nicht durchführbar, da ein anti-apoptotisch wirkender Ligand in der Tumorthherapie nicht zielführend ist. Im Hinblick auf die Bildgebung bestehen jedoch Anwendungsmöglichkeiten, da es zu einer Internalisierung der Rezeptoren mit den entsprechenden Liganden kommt und diese gemäß den zu verwendenden bildgebenden Methoden anpassbar sind. Vor allem HexGua sticht hier mit seiner hohen Internalisierungsrate auf Zellen mit CXCR4 hervor. Ein geeigneter Anwendungsbereich für

diese Substanz wäre, wie oben bereits beschrieben, auf Tumorzellen, die CXCR4 exprimieren, an Orten, an denen das physiologische Gewebe jedoch kein oder nur sehr wenig CXCR4 präsentiert. Im Gegensatz dazu wirken die bekannten CXCR4/7-Antagonisten AMD3100 als nicht-peptiderger CXCR4-Inhibitor [Bridger et al., 1995] und CCX733 als CXCR7-Inhibitor [Hartmann et al., 2008] pro-apoptotisch bzw. heben die Wirkung der Liganden auf und verursachen so natürliche Apoptoseraten. Hier läge ein Ansatz für eine Weiterentwicklung der Liganden, indem die als Antagonisten eingestuften Stoffe AMD3100 und CCX733, welche ebenfalls eine Rezeptorinternalisierung auslösen [Hattermann et al., 2014], aufgrund der Erfahrung mit synthetischen Liganden in dem Maße ummodelliert werden, dass sie als Marker für die Bildgebung bei Beibehaltung der antagonistischen Eigenschaften zu dienen.

5.3 Einsatz synthetischer Liganden in der Krebsdiagnostik und -therapie

Die Herstellung spezifischer Liganden für Chemokinrezeptoren ermöglicht die Markierung von Rezeptoren auf Zelloberflächen und deren Detektion mittels geeigneter Bildgebungen, wie die Positronenemissionstherapie (PET) durch $^{68}\text{Ga}^{3+}$ [Gourni et al., 1011], die Singlephotonenemissionstomographie durch zum Beispiel $^{111}\text{In}^{3+}$ oder die Magnetresonanztomographie (Gd^{3+} , Fe^{3+}) [Bonnet et al., 2010]. Auch eine spezifische Therapie mit Radionucliden wie $^{177}\text{Lu}^{3+}$ oder $^{90}\text{Y}^{3+}$ ist denkbar.

Hierbei kann nomenklatorisch zwischen Tracern und Radiopharmaka unterschieden werden. Tracer sind Trägersubstanzen mit radioaktiv markierten Isotopen, die die Körperfunktion nicht beeinflussen. Für dieses nuklearmedizinisch-diagnostische Verfahren erhielt der Ungar George de Hevesy 1943 den Nobelpreis für Chemie [Myers WG, 1979].

Die in der Nuklearmedizin genutzten Arzneimittel mit therapeutischer Wirkung werden hingegen als Radiopharmaka bezeichnet und haben unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften in Hinblick auf Pharmakokinetik und Pharmakodynamik.

Zur größeren Effektivität dieser bildgebenden Möglichkeiten muss zum Ausschluss von Artefakten oder stärkeren Nebenwirkungen eine möglichst hohe Tumorspezifität angestrebt werden. Der Rezeptor CXCR4 zum Beispiel wird zwar auch durch hämatopoetische Zellen, Leukozyten und Endothelzellen an der Zelloberfläche exprimiert, aber nicht auf gesunden Brustzellen [Müller et al., 2001]. Ein Einsatz der markierten synthetischen Liganden in der Bildgebung und Therapie von Mammakarzinomen ist also denkbar und wie in Abbildung 17 am Tiermodell [Gourni et al., 2011] gezeigt mit den untersuchten Liganden auch möglich.

Ebenso ist ein Einsatz von spezifischen Liganden beim Prostatakarzinom möglich. In einer Arbeit der Nuklearmedizin Freiburg wurde mithilfe von Gastrin-freisetzenden-peptid-Rezeptoren an Prostatakarzinomen aufgezeigt, dass mithilfe von mit ^{64}Cu -markierten Rezeptorantagonisten eine deutlich verbesserte Bildgebung möglich ist [Wieser et al., 2014]. Da die Expressionsstärke von CXCR7 direkt mit der Tumoraggressivität korreliert [Wang et al., 2011], wäre mit den untersuchten synthetischen Liganden ebenfalls eine hohe Trefferquote zu erwarten.

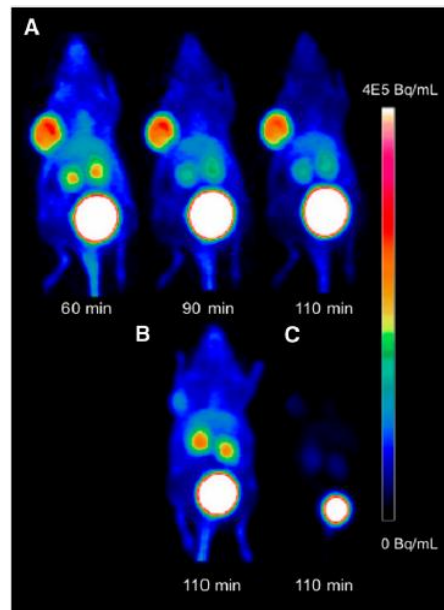


Abbildung 17: Positronenemissionstomographische Darstellung von OH1-Tumor-positiven Mäusen mittels Ga-CPCR4-2 [Gourni et al., 2011].

Es zeigt sich bei allen Mäusen nach Injektion von Ga-CPCR4-2 eine Anreicherung von Kontrastmittel im Tumorgewebe (weiß). Bei B fand eine zusätzliche Injektion von FC-131 und bei C von AMD3100 statt, sodass die Genauigkeit der Auflösung erhöht werden konnte.

Durch den Vorgang der Internalisierung können sowohl Stoffe in die Zelle aufgenommen, als auch die Aktivität von signalauslösenden Liganden gesteuert werden. Meist läuft die Internalisierung in Endosomen über „Clathrin-coated vesicles“ ab. Dies ist der schnellere Weg im Vergleich zu Caveolin. Diesen Effekt könnte man sich zunutze machen, um das Einbringen zytotoxischer Substanzen in Tumorzellen oder die Bildgebung zu spezifizieren. Wie von Demmer et al., 2011 beschrieben, gäbe es die Möglichkeit diesen Vorgang für eine gesteuerte Krebstherapie anzuwenden. Gegenüber der nur CXCR4 exprimierenden Zelllinie ist diese Annahme auch zutreffend, da mit Ausnahme von Ga-CPCR4 alle synthetischen Liganden eine deutlich höhere Internalisierungsrate aufweisen. Die Bildung von Rezeptordimeren zwischen CXCR4 und CXCR7 [Luker et al., 2009] führt zwar unter Nutzung aller Liganden zu einer Internalisierung, jedoch sind die Unterschiede zu gering,

um von einer speziellen Ansteuerung zu sprechen. Der beschriebene Weg ist also entgegen der in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten für eine spezifische Ansteuerung und verbesserte Internalisierung unter Einbeziehung der pro-apoptotischen Wirkungen der synthetischen Liganden zunächst denkbar ungeeignet.

Unter Berücksichtigung der Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge von Mammakarzinomen ist eine adjuvante Chemotherapie, das bedeutet eine Chemotherapie nach Operation, bei HER2-positiven Tumoren, endokrin nicht sensitiven Tumoren, nodal-positiven Tumoren, nodal-negativen Tumoren bei gleichzeitig hohem Rezidivrisiko und bei einem jungen Erkrankungsalter unter 35 Jahren; sowie bei schon metastasierten Mammakarzinomen indiziert. Auch eine neoadjuvante Chemotherapie, das heißt eine Therapie vor der Operation, ist möglich. Bei einer Chemotherapie werden allgemein verschiedene Zytostatika eingesetzt, die besonders schnell regenerierende Zellverbände angreifen [Arteaga, 2013]. Es gibt dabei eine Vielzahl an Protokollen für unterschiedliche Tumorarten und -stadien. Da Tumore häufig durch ein rasches Wachstum gekennzeichnet sind, sprechen sie besonders gut auf Zytostatika an, wobei sich die Nebenwirkungen vor allem primär an physiologisch schnell wachsenden Zellverbänden erkennen lassen. Häufige Nebenwirkungen sind Haarausfall und Blutbildveränderungen [Pabla et al., 2012]. Im Hauptprinzip werden die Zielzellen durch die Zytostatika abgetötet, aufgrund der Nebenwirkungen sind die Dosen und Therapiezeiten jedoch limitiert, sodass meist in mehreren Chemotherapiezyklen behandelt wird. Da es in den Therapiepausen aber auch zu einer Regeneration des Tumors kommt, gilt in der Krebstherapie die Vorgabe sehr früh und aggressiv zu therapieren [Goldie et al., 1979].

Ein Einsatz der synthetischen Liganden zum Zeitpunkt eines aktiven Chemotherapiezyklus wäre dementsprechend, aufgrund der anti-apoptotischen Eigenschaften, kontraproduktiv. Aufgrund des mathematischen Effekts einer prozentual immer gleichen Zellreduzierung ist es notwendig eine hohe Zahl an Zyklen anzusetzen, um möglichst alle Krebszellen zu vernichten. Gerade die letzten überlebenden Zellen bergen hierbei das Risiko, resistent zu sein [Mehta et al., 2001]. Diese beginnenden Resistenzen führen hierbei mit fortschreitender Therapiedauer häufig zu einer Verschlechterung des Therapieergebnisses.

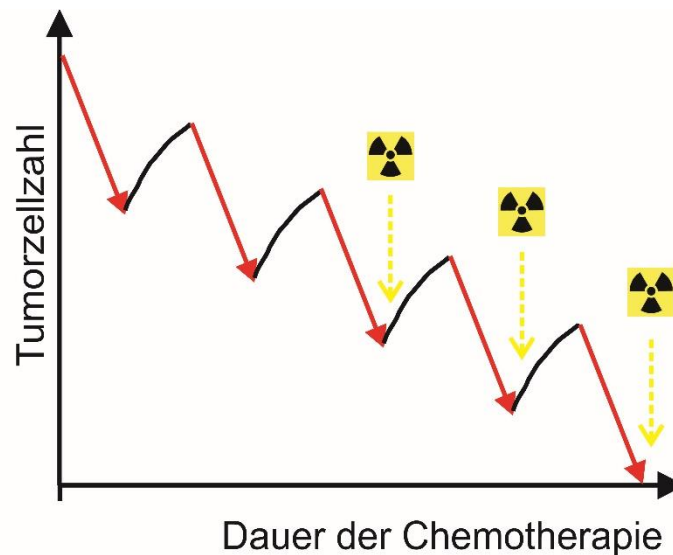


Abbildung 18: Möglicher Einsatzzeitpunkt radiologisch detektierbarer Liganden in der Chemotherapie zur Abschätzung der restlichen Tumormasse, modifiziert nach Skipper et al., 1964

Eine genaue Vermessung der Tumorgröße ist gerade im fortgeschrittenen Stadium der Chemotherapie wichtig, um eine vollständige Tumoreliminierung bei gleichzeitig geringstmöglichen Nebenwirkungen zu erzielen. Aufgrund beobachteter anti-apoptotischer Eigenschaften der radiologisch detektierbaren, spezifischen synthetischen Liganden sollte ihr Einsatz in zeitlichem Abstand zum Ende einer Zytostatikagabe (hier rot) erfolgen, da dann sichergestellt ist, dass keine Liganden beim nächsten Chemozyklus mehr anti-apoptotisch wirken können.

Da mit steigender Zyklenzahl die Nebenwirkungen steigen, sollte rechtzeitig detektiert und abgeschätzt werden, wie groß der noch benötigte Therapieaufwand ist. Der Einsatz von z.B. synthetischen, radiologisch detektierbaren CXCR4-Liganden in der Brustkrebsdiagnostik wäre in einer Therapiepause durchaus denkbar. Die anti-apoptotischen Eigenschaften wären vernachlässigbar, da zu diesem Zeitpunkt keine Apoptose ausgelöst wird und die Liganden später wieder ausgeschieden werden, wie es bei anderen Kontrastmitteln und Tracern der Fall ist [Wieser et al., 2014]. Durch die Internalisierung hätte man ein gutes Signal-Noise-Verhältnis, da nur wenige Liganden diffus auftreten und unspezifisch detektierbare Liganden in den Ausscheidungsorganen wie Niere, Blase und Darm zu finden sein sollten.

Wie aufgezeigt wurde, spielen Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie. Ihr vermehrtes Auftreten auf bestimmten Tumorarten kann durch radiologisch detektierbare Liganden zu einer verfeinerten Diagnostik und daraus folgenden schonenderen Therapie genutzt werden. Die natürlichen und synthetischen Liganden können sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirken und Wachstumsprozesse beeinflussen.

Nicht immer sind die agonistischen Effekte wie bei den untersuchten synthetischen

Liganden gewünscht. Gegenstand weiterer Forschung sollte daher die Modifizierung von als pro-apoptotisch geltenden Liganden zur radiologischen Detektierbarkeit und deren erneute Überprüfung in einem Zellmodell sein, um eine diagnostische Anwendbarkeit zu realisieren.

6 Zusammenfassung

Die Aktivierung und Steuerung verschiedener Zellen über die hier im Besonderen untersuchten Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und ihrer natürlichen Liganden ist schon seit längerem Gegenstand der Tumorforschung. Die durch eine Münchner Arbeitsgruppe modifizierten, radiologisch detektionsfähigen Liganden HexGua, FC131, Phe-5-ActZ und Ga-CPCR4 wurden gegenüber den natürlichen Liganden CXCL11 und CXCL12 auf ihr Internalisierungsverhalten und ihre biologischen Effekte als Agonisten bzw. Antagonisten untersucht.

Als Modell dienten die Neuroblastomzelllinie SK-NSH, welche an der Zelloberfläche CXCR4 exprimiert und die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit sowohl CXCR4, als auch CXCR7 an der Zelloberfläche.

Die Rezeptorinternalisierung bei Stimulation mit den synthetischen und natürlichen Liganden wurde mittels immunzytochemischer Färbungen mit Antikörpern gegen die extrazellulären Domänen der Rezeptoren untersucht. Hierbei waren FC131 und HexGua bei beiden Zelllinien die Liganden mit der stärksten Internalisierung, wohingegen Phe-5-ActZ und Ga-CPCR-4 ähnliche bis schwächere Internalisierungsraten als CXCL11 und CXCL12 zeigten.

Möglicherweise könnte der gerichtete Einsatz von für die Bildgebung geeigneten Liganden zu einer genaueren radiologischen Darstellung und damit schonenderen Krebstherapie führen.

Die Untersuchung der Apoptoseregulation durch morphologische Markierung der Zellkerne und deren quantitativer Analyse sollte Auskunft geben, ob sich die Apoptoseeigenschaften der Zellen gegebenenfalls beeinflussen und steuern lassen, was möglicherweise pharmazeutisch relevant Anwendung finden könnte. Sowohl die natürlichen als auch die synthetischen Liganden inhibierten die Apoptose. Am Modell SK-NSH zeigte sich, dass FC131 und Ga-CPCR4-2 einen deutlich höheren Einfluss auf die Senkung der Apoptoserate haben, als HexGua, Phe-5-ActZ oder der natürliche Ligand CXCL12. Bei den MCF-7-Zellen führen zwar alle Liganden zu einer Senkung der Apoptoserate, jedoch war die Wirkung des natürlichen Liganden hierbei stärker. Die erhoffte selektive Steuerung der Apoptose zur gerichteten Krebstherapie kann somit nicht genutzt werden. Ein Einsatz in der Chemotherapie wäre aber in den Pausen ohne Zytostatika möglich um eine Bildgebung zu erhalten, da in dieser Phase kein Zelltod ausgelöst wird und bis zum nächsten Chemotherapiezyklus die Liganden wieder abtransportiert würden.

7 Quellenverzeichnis

Krebs in Dtl. 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin (2015)

Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820 (2007)

Arteaga CL. Progress in breast cancer: overview. *Clin Cancer Res* 19, 6353-9 (2013)

Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-8 (1998)

Balkwill, F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in Cancer Biology* 14, 171-179 (2004)

Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The Lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-33 (1996)

Bridger GJ, Skerlj RT, Thornton D, Padmanabhan S, Martellucci SA, Henson GW, Abrams MJ, Yamamoto N, De Vreese K, Pauwels R et al. Synthesis and structure-activity relationships of phenylenebis(methylene)-linked bis-tetraazamacrocycles that inhibit HIV replication. Effects of macrocyclic ring size and substituents on the aromatic linker. *J Med Chem* 38, 366-78 (1995)

Bonnet CS, Tóth E. Smart MR imaging agents relevant to potential neurologic applications. *AJNR Am J Neurorad* 31, 401-9 (2010)

Burns J, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sushine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203, 2201-13 (2006)

Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, Evans CL, Samkoe KS, Verma S, Pogue BW, Hasan T. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem Rev* 110, 2795-838 (2010)

Chae HJ, Kang JS, Byun JO, Han KS, Kim DU, Oh SM, Kim HM, Chae SW, Kim HR. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol Res* 42, 373-81 (2000)

Chen C. Periodontitis as a biofilm infection. *J Calif Dent Assoc* 29, 362-9 (2001)

Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Oqborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): A novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med*. 187, 2009-21 (1998)

De Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Naqata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol* 79, 1081-8 (2008)

De Clerq E. The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol* 77, 1655-1664 (2009)

Demmer O, Dijkgraaf I, Schumacher U, Marinelli L, Cosconati S, Gourni E, Wester HJ, Kessler H. Design, Synthesis, and Functionalization of Dimeric Peptides Targeting Chemokine Receptor CXCR4. *J Med Chem* 54, 7648-62 (2011)

Erdel M, Theurl M, Meyer M, Duba HC, Utermann G, Werner-Felmayer G. High-resolution mapping of the human 4q21 and the mouse 5E3 SCYB chemokine cluster by fiber-fluorescence in situ hybridization. *Immunogenetics* 53, 611-5 (2001)

Flomenberg N, Devine SM, Dpersio JF, Lieveld JL, McCarty JM, Rowley SD, Vesole DH, Badel K, Calandra G. The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 106, 1867-74 (2005)

Gourni E, Demmer O, Schottelius M, D'Alessandria C, Schulz S, Dijkgraaf I, Schumacher U, Schwaiger M, Kessler H, Wester HJ. PET of CXCR4 expression by (68)Ga-labeled highly specific targeted contrast agent. *J Nucl Med* 52, 1803-10 (2011)

Goldie JH, Coldmann AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* 63, 1727-33 (1979)

Gourni E, Demmer O, Schottelius M, D'Alessandria C, Schulz S, Dijkgraaf I, Schumacher U, Schwaiger M, Kessler H, Wester HJ. PET of CXCR4 expression by a (68)Ga-labeled highly specific targeted contrast agent. *J Nucl Med* 52, 1803-10 (2011)

Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolksy R, Shulman Z, Buss EC, Spiegel A, Nagler A, Lapidot T, Thelen M, Alon R. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *J Leukoc Biol* 84, 1130-40 (2008)

Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerkoster SS, Penfold ME, Schall TJ, Mentlein R. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res* 70, 3299-308 (2010)

Hattermann K, Holzenburg E, Hans F, Lucius R, Held-Feindt J, Mentlein R. Effects of the chemokine CXCL12 and combined internalization of its receptors CXCR4 and CXCR7 in human MCF-7 breast cancer cells. *Cell Tissue Res* 357, 253-66 (2014)

Hernandez L, Magalhaes MA, Coniglio SJ, Condeelis JS, Segall JE. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 2011;13(6): R128. Doi: 10.1186/bcr3074. Epub 2011 Dec 9

Infantino S, Moepps B, Thelen M. Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *J Immunol* 176, 2580-2593 (2009)

Janowski M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell Adh Migr* 3, 243-9 (2009)

Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokine receptors and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 79, 639-51 (2006)

- Katz JJ. Anhydrous trifluoroacetic acid as a solvent for proteins. *Nature* 174, 509 (1954)
- Kent DL. Age-relates macular degeneration: beyond anti-angiogenesis. *Mol Vis* 6, 46-55 (2014)
- Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 113, 6085-93 (2009)
- Luker KE, Gupta M, Luker GD. Imaging chemokine receptor dimerization with firefly luciferase complementation. *FASEB J* 23, 823-34 (2009)
- Luttrell LM, Miller WE. Arrestins as regulators of kinases and phosphatases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 118, 115-47 (2013)
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-Protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11406-11 (2003)
- Mc Bride JW, Balestrero A, Ghezzi L, Tribulato G, Cross KJ. Optical fiber imaging for high speed plasma motion diagnostics: applied to low voltage circuit breakers. *Rev Sci Instrum* 81, 055109 (2010)
- Mehta RS, Bornstein R, Yu IR, Parker RJ, McLaren CE, Nguyen KP, Li KT, Fruehauf JP. Breast cancer survival and in vitro tumor response in the extreme drug resistance assay. *Breast Can Res Treat* 66, 225-37 (2001)
- Mentlein R, Hattermann K, Held-Feindt J. Migration, Metastasis and More: The Role of Chemokines in the Proliferation, Spreading and Metastasis of Tumors. In *Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research*. Rusende U, Ulrich H eds. (Springer Science+Business Media Dordrecht) (2013)
- Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TJ. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 15735-40 (2007)
- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25, 75-84 (2004)
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of Chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-6 (2001)
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Review* 52(1), 145-76 (2000)
- Myers WG. George Charles de Hevesy: the father of nuclear medicine. *J Nucl Med* 20, 590-4 (1979)
- Nagasawa T. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *J Mol Med (Berl)* 92(5), 433-9 (2014)

- Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 2305-9 (1994)
- Odemis V, Lipfert J, Kraft R, Hajek P, Abraham G, Hattermann K, Mentlein R, Engele J. The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia* 60,372-82 (2012)
- O'Havre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J* 409(3), 635-49 (2008)
- Oppermann M, Mack M, Proudfoot AE, Olbrich H. Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus. *J Biol Chem* 274, 8875-85 (1999)
- Pabla N, Dong Z. Curtailing side effects in chemotherapy: a tale of PKC δ in cisplatin treatment. *Oncotarget* 3, 107-11 (2012)
- Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodont* 36, 575-80 (2009)
- Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* 265(2), 137-65 (2007)
- Rani MR, Foster GR, Leung S, Leaman D, Stark GR, Ransohoff RM. Characterization of beta-R1, a gene is selectively induced by interferon beta (IFN-beta) compared with IFN-alpha. *J Biol Chem* 271, 22878-84 (1996)
- Re F, Muzio M, De Rossi M, Polentarutti N, Giri JG, Mantovani A, Colotta F. The type II "receptor" as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *J Exp Med* 179, 739-43 (1994)
- Savaiya PJ, Guo D, Ulasov I, Gabikian P, Lesniak MS. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget* 4, 2171-85 (2013)
- Schwarz F, Aoki A, Becker J, Sculean A. Laser application in non-surgical periodontal therapy. A systematic review. *J Clin Periodont* 38, 29-44 (2008)
- Shimizu S, Brown M, Sengupta R, Penfold ME, Meucci O. CXCR7 protein expression in human adult brain and differentiated neurons. *PLoS One*. 6(5):e 20680 (2011)
- Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martinez-A C, Mackay CR, Mackay F. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 14759-14764 (2007)
- Singh A, Arya RK, Trivedi AK, Sanyal S, Baral R, Dormond O, Briscoe DM, Datta D. Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4, CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev*. 24, 41-9 (2013)

Skipper HE. Perspectives in Cancer Chemotherapy: Therapeutic Design. *Cancer Res.* 24, 1295-302 (1964)

Tamamura H, Hiratsu K, Ueda S, Wang Z, Kusano S, Terakubo S, Trent JO, Peiper SC, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. Stereoselective synthesis of [L-Arg-L/D-3-(2-naphthyl)alanine]-type (E)-alkene dipeptide isosteres and its application to the synthesis and biological evaluation of pseudopeptide analogues of the CXCR4 antagonist FC131. *J Med Chem* 48, 380-91 (2005)

Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600-3 (1993)

Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R, Taichman RS. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* 283, 4283-94 (2008)

Wani N, Nasser MW, Ahirwar DK, Zhao H, Miao Z, Shilo K, Ganju RK. C-X-C motif chemokine 12/C-X-C chemokine receptor type 7 signaling regulates breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor environment. *Breast Cancer Res.* 16, R54 (2014)

Wieser G, Mansi R, Grosu AL, Schultze-Seemann W, Wumont-Walter RA, Meyer PT, Maecke HR, Reubi JC, Weber WA. Positron emission tomography (PET) imaging of prostate cancer with gastrin releasing peptide receptor antagonist—from mice to men. *Theranostics* 4, 412-9 (2014)

Zlotnik A. Chemokines and Cancer. *Int J Cancer* 119, 2026–9 (2006)

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2, 121-7 (2000)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gern ein paar Worte an Personen richten, die mich beim Entstehen dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Meine ersten Worte des Dankes richten sich an die fleißigen „Mädels“ im Labor Miriam Lemmer, Sonja Dahle und Martina Burmester, die auch der traurigsten Zellkultur wieder Wachstum bescherten und immer ein offenes Ohr haben.

Hervorheben muss ich hierbei Judith Becker, die mir so oft mit Rat und Tat zur Seite stand und dabei nie aus der Ruhe zu bringen war. Vielen Dank für deine Unterstützung.

Überhaupt erst ermöglicht haben mir das Schreiben dieser Arbeit Prof. Dr. Rolf Mentlein und PD Dr. Kirsten Hattermann-Koch, die ich als „Doktorkind“ sicher auch vor so manche Probe gestellt habe. Danke an dieser Stelle für jede Aufmunterung, jeden notwendigen Tritt und eine konsequente Unterstützung, wie man sie als Doktorand sicher nicht immer auf diesem Wege erlebt.

Im Hinblick auf die notwendige Motivation kann ich auch meinen Freunden und Verwandten nicht genug danken. Ich habe euch all die komischen Sätze, bei denen ihr oft nach dem ersten Komma schon raus wart, so oft um die Ohren gehauen und ihr habt nie geklagt und immer versucht mir zu helfen.

Meinem Bruder verdanke ich an dieser Stelle wohl auch das Pausieren nie zu vergessen, denn danach ist doch der Kopf viel freier.

Mama, Papa, Max ***

Lebenslauf:

Name: Alina Schröter
Nationalität: deutsch
Geburtsdatum/-ort: 30.03.1990 in Schwedt/Oder

Schulbildung

1996-2002 Astrid-Lindgren-Grundschule, Schwedt/Oder
2002-06/2009 Carl-Friedrich-Gauß Gymnasium, Schwedt/Oder

Studium/Ausbildung

10/2009-11/2014 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2010 Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Vorphysikum)
03/2013 Beginn der Promotionsarbeit in der AG Hattermann/Mentlein
03/2012 Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum)
11/2014 Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen)
01/2015-06/2015 Assistenz Zahnärztin in der Gemeinschaftspraxis Dres. Stumpf in Schwedt/Oder
10/2016-heute Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Coralie Narr in Falkensee

Veröffentlichungen

Poster:

Hattermann, Schottelius, Becker, Schröter, Gebhardt, Wester, Mentlein. In vitro investigation of cxcr4 and cxcr7 endocytosis upon stimulation with novel peptidic ligands. Anatomische Gesellschaft 109. Jahrestagung, Salzburg, 24.-27. September 2014. Abstract-Band p.58, Poster p58. (2014)