

Expression und Funktion des Orexinrezeptors 1 in Tumoren des humanen Gastrointestinaltrakts

**Dissertation zur Erlangung des akademischen
Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Dipl. Biol. Bianca Bolewski
aus Berlin

2012

Diese Arbeit wurde angefertigt von Juli 2007 bis März 2012 unter der Leitung von Dr. Carsten Grötzinger in der Arbeitsgruppe "Tumortargeting" an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum in der Medizinischen Klinik m.S. Hepatologie, Gastroenterologie.

1. Gutachter: Dr. Carsten Grötzinger
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 22.06.2012

„Wer A sagt, der muß nicht B sagen. Er kann auch erkennen, daß A falsch war.“

Bertolt Brecht (1898-1956)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	1
1.1.1	Klassifikation.....	2
1.1.2	Signalwege	4
1.2	GPCR-vermittelte Peptid-basierte Tumordiagnostik/ -therapie	7
1.3	Orexinrezeptoren und Orexine	10
1.3.1	Entdeckung und Struktur.....	10
1.3.2	Expressionsorte	11
1.3.3	OXR1-vermittelte Effekte	14
1.3.4	Physiologische Funktionen.....	17
1.4	Ösophaguskarzinome	19
1.5	Ziel der Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Apparate und Geräte.....	23
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3	Chemikalien.....	24
2.1.4	Antikörper	26
2.1.5	Peptide	26
2.1.6	Enzyme	26
2.1.7	Kits	27
2.1.8	Standards	27
2.1.9	Primer und Plasmide.....	27
2.1.10	Zellen.....	28
2.1.11	Materialien für die Zellkultur	28
2.1.12	Puffer und Lösungen	29
2.1.13	Software.....	30
2.2	Methoden	30
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.2	Zellbiologische Methoden	35
2.2.3	Funktionelle Methoden.....	36
2.2.4	Biochemische Methoden	46
2.2.5	Tierexperimentelle Methoden	48
2.2.6	Statistik.....	48

3	Ergebnisse	49
3.1	Antikörpervalidierung	49
3.1.1	Detektion des Orexinrezeptors 1 (OXR1) im überexprimierten System.....	49
3.2	Expressions-Charakterisierung.....	54
3.2.1	Expression des OXR1 in humanen Tumoren des Gastrointestinaltrakts.....	54
3.2.2	Expressionsmuster für die diagnostisch/therapeutische Anwendung.....	60
3.2.3	Zelltypisierung der OXR1 exprimierenden Zellen im humanen Normalgewebe und Tumorgewebe des Ösophagus.....	63
3.2.4	OXR in humanen gastrointestinalen Tumorzelllinien – RNA-Ebene	65
3.2.5	Zelluläre und Subzelluläre Lokalisation des OXR1 in humanen gastrointestinalen Tumorzelllinien	66
3.2.6	Detektion des OXR1 im Mausmodell	69
3.3	Funktion des OXR1.....	73
3.3.1	Zelluläre Liganden-Effekte	73
3.3.2	OXR1-vermittelte Signaltransduktion.....	76
4	Diskussion.....	93
4.1	Der OXR1 im humanen Gewebe des GIT und Tumorzelllinien.....	93
4.2	Der Orexinrezeptor 1 als molekulare Zielstruktur im Tumor.....	98
4.3	OXR1-vermittelte Effekte.....	103
4.3.1	Zelluläre Effekte.....	103
4.3.2	Signaltransduktion.....	104
5	Zusammenfassung.....	112
6	Summary	114
7	Literaturverzeichnis.....	115
8	Anhang	i

1 Einleitung

Äußere Reize und Signale werden von Rezeptoren in der Zellmembran erkannt und in das Zellinnere geleitet. Durch diese Signal-Rezeptor-Interaktion werden sekundäre Botenstoffe gebildet, die ihrerseits wieder andere zelluläre Effektoren modulieren. Die Übersetzung der extrazellulären Stimuli ins Zellinnere (Signaltransduktion) führt zu einer Generierung von sekundären Botenstoffen, die wiederum Signalkaskaden auslösen oder inhibieren und so zu veränderten Genexpressionen führen, denen unterschiedliche zelluläre Effekte folgen.

1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen die größte Genfamilie im menschlichen Genom dar und die größte Familie von Zelloberflächen-Rezeptoren (Fredriksson, et al., 2003; Lagerström & Schiöth, 2008).

Mehr als die Hälfte aller Medikamente wirken auf GPCRs, dabei imitieren sie natürliche extrazelluläre Signalmoleküle (Liganden) der GPCRs, blockieren die Bindungsstellen für natürliche Liganden oder modulieren die biologische Aktivität endogener Liganden auf GPCRs (Allosterische Modulatoren) (Flower, 1999; Groom & Hopkins, 2002; Hopkins & Groom, 2002; Wang et al., 2009). Die Ligandenbindung an einen GPCR führt zur Aktivierung heterotrimerer GTP-bindender Proteine (G-Proteine), die das Signal an Effektoren vermitteln. Dabei wird ein GDP/GTP-Austausch am heterotrimeren G-Protein, das am GPCR intrazellulär gebunden ist, durch die aktive Form des GPCRs induziert. Dies führt zur Dissoziation des G-Proteins in zwei Untereinheiten, welche ihrerseits verschiedene Signalwege aktivieren bzw. inaktivieren und so zu spezifischen zellulären Antworten führen (Bockaert & Pin, 1999).

Die Rezeptorfamilie der GPCRs wird durch viele unterschiedliche Liganden aktiviert. Hierzu zählen Amine, Purine und Nukleinsäure-Derivate, Lipide, Peptide sowie Proteine, Geruchsstoffe, Pheromone, Geschmacksstoffe, Ionen wie Ca^{2+} und Protonen und sogar Photonen (Laburthe & Couvineau, 2002; Laburthe et al., 1996; Lagerström & Schiöth, 2008; Takeda et al., 2003; Vassilatis et al., 2003). Diese diversen Liganden entsprechen den verschiedenartigen physiologischen Funktionen der GPCRs in Neurotransmission, Sekretionsregulation exokriner und endokriner Drüsen, Zellwachstum und Differenzierung, Embryogenese und chemotaktische Reize. Außerdem vermitteln GPCRs Geschmacks-, Geruchs- und Bildsignale (Hall et al., 1999).

Charakterisierend für die Familien der GPCRs ist ihre Struktur. Der extrazelluläre Aminoterminus (N-Terminus) und der intrazelluläre Carboxyterminus (C-Terminus) sind über sieben alpha-helikale Transmembrandomänen (TMDs) miteinander verbunden (Abb. 1). Diese sieben TMDs verankern bzw. fixieren den Rezeptor in der Plasmamembran. Dieses Merkmal führt dazu, dass die GPCRs der Superfamilie der sieben Transmembran-(7TM-)Rezeptoren unterordnet werden (Serebryany et al., 2011). Es wurden etwa 140 (7TM)-Rezeptorgene identifiziert, denen noch kein Ligand zugeordnet

werden konnte, weshalb diese als „*orphan*“-Rezeptoren bezeichnet werden (Civelli et al., 2006; Jacoby, 2006; Jacoby et al., 2006; Lefkowitz, 2004; Tang et al., 2012).

1.1.1 Klassifikation

Aufgrund physiologischer und struktureller Merkmale werden die GPCRs in Klassen eingeteilt. Das meistbenutzte Klassifizierungssystem teilt die GPCRs in A-F Gruppen/Familien ein (Attwood & Findlay, 1994; Fredriksson et al., 2003; Kolakowski, 1994).

Die Klassen D und E konnten in Säugetieren nicht nachgewiesen werden (Attwood & Findlay, 1994; Fredriksson et al., 2003; Gloriam, Fredriksson, & Schiöth, 2007; Harmar et al., 2009; Horn et al., 1998; Kolakowski, 1994). Die Klasse F vereinigt die Frizzled-Rezeptoren und die Taste2-Rezeptoren (Schiöth & Fredriksson, 2005).

Die Klasse A der GPCRs, auch *rhodopsin-like family* genannt, stellt die größte Unterfamilie der GPCRs dar. Hierzu zählen um 78 % aller GPCRs im Menschen (Foord et al., 2005). Auch die in dieser Arbeit untersuchten Orexinrezeptoren gehören dieser Familie an. Gemeinsames Merkmal der meisten Klasse-A-GPCRs ist ein kurzer N-Terminus und ein Palmitoylrest innerhalb des C-Terminus, der als Membrananker fungiert (Lagerström & Schiöth, 2008). Des Weiteren sind hoch konservierte Aminosäuren in der siebten TMD (NSxxNPxxY Motif) und am Übergang der dritten TMD zur zweiten intrazellulären Schleife (DRY Motif) zu finden (Schiöth & Fredriksson, 2005). Ein familienübergreifendes gemeinsames Merkmal ist die die erste und zweite extrazelluläre Domäne (EZM) miteinander verbindende Disulfidbrücke (George et al., 2002). Die Liganden der Klasse-A-GPCRs sind sehr unterschiedlich, hierzu gehören Amine (Histamine, Serotonin), Peptide (Somatostatin, Orexin, Chemerin), Glykohormone und Lipide. Sie binden an Duft-, Peptid- und Glykoproteinrezeptoren der Klasse-A-GPCRs. Dazu zählen auch die GPCRs der Neurotransmitter Adrenalin, Dopamin und Serotonin. Die Kristallstrukturen mehrerer GPCRs der Klasse A konnten stabilisiert werden. Diese haben zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus von GPCRs beigetragen. Es wird vermutet, dass die Liganden in einer Vertiefung zwischen den TMD binden und nicht wie bei anderen Familien dem N-Terminus eine Schlüsselrolle zukommt (Schiöth & Fredriksson, 2005).

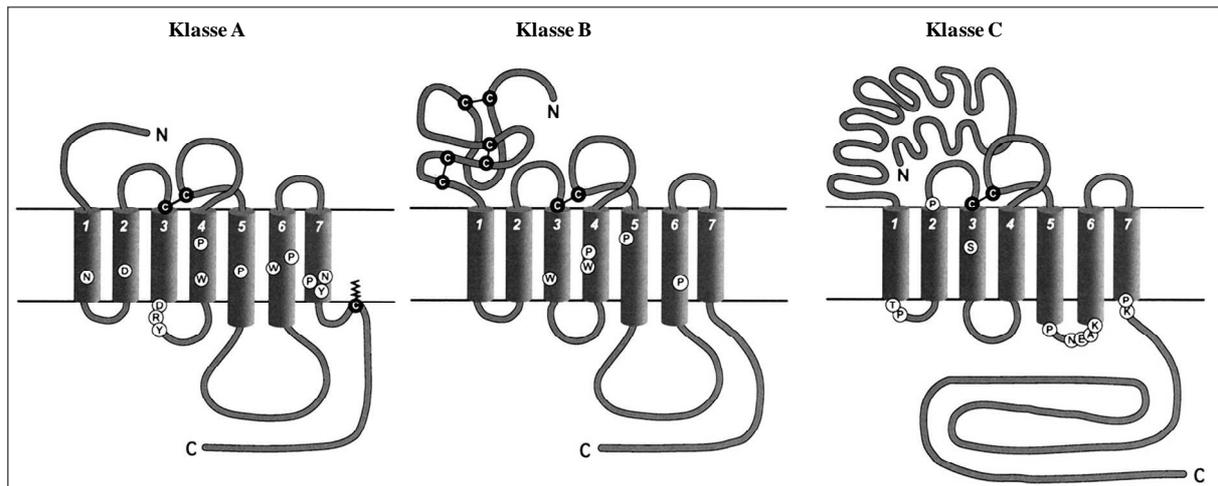


Abb. 1: Schematische Darstellung der drei größten Klassen von GPCRs.

(Nach Gether, 2000). Gekennzeichnet sind konservierte Aminosäuren (weiße Kreise), konservierte Disulfidbrücken (schwarze Kreise) und die Palmitoylierungsstelle im C-Terminus.

Zur Klasse B gehören Calcitonin/Glucagonrezeptor-ähnliche Rezeptoren. Beispiele sind hier die Corticotropin-releasing hormone-Rezeptoren, Parathyroidhormonrezeptoren, VIP/PACAP-Rezeptoren und die Secretinrezeptor-Familie.

Zu den Liganden zählen hier die Hormone mit hohem Molekulargewicht, wie Glucagon, Sekretin u.a. Außer der Disulfidbrücke zwischen der ersten extrazellulären Domäne und der zweiten extrazellulären Domäne haben sie keinerlei Sequenzhomologien mit anderen GPCRs. Die Rezeptoren der Familie B haben einen relativ großen N-Terminus (ca. 120 Aminosäuren), der über mehrere Disulfidbrücken verfügt (George et al., 2002; Gether, 2000; Ulrich et al., 1998). Man geht davon aus, dass der Ligand durch den N-Terminus unter Beteiligung der transmembranären Bereiche gebunden wird.

Der Klasse C gehören weitaus weniger Rezeptoren an. Dazu zählen u.a. die metabotropen Glutamat-Rezeptoren, der Calcium-sensing-Rezeptor (CASR), Taste-Rezeptoren (TAS1) und die GABA-Rezeptoren (Fredriksson et al., 2003; Schiöth & Fredriksson, 2005).

Ein charakteristisches Merkmal dieser Rezeptoren ist ihr sehr langer N-Terminus (ca. 600 Aminosäuren) und eine sehr kurze hoch konservierte dritte intrazelluläre Domäne. Die Bindungsdomäne der Liganden befindet sich im N-Terminus des Rezeptors und wird als „*venus flytrap domain*“ bezeichnet, da sie sich nach der Bindung des Liganden schließt (Rondard et al., 2011; Urwyler, 2011).

Ein neues Klassifizierungssystem basierend auf phylogenetischen Untersuchungen (GRAFS- oder Fredriksson-System) schafft für die Secretinrezeptor-Familie eine eigenständige Gruppe und ordnet sie nicht mehr mit den Adhäsionsrezeptoren der Klasse B zu (Fredriksson et al., 2003; Schiöth & Fredriksson, 2005).

1.1.2 Signalwege

1.1.2.1 G-Proteine

Der klassische Signalweg nach GPCR-Aktivierung verläuft über die aktive Konformation des Rezeptors als Guanine-Nukleotide-Austauschfaktor (GEF), schematisch dargestellt in Abb. 2. Der Signalkomplex besteht aus dem Rezeptor und einem Heterotrimeren G-Protein, zusammengesetzt aus einer $G\alpha$ -GDP und einer $G\beta\gamma$ -Untereinheit (Gilman, 1987; Ross & Wilkie, 2000). Die zweite und dritte intrazelluläre Schleife und die proximale Region des C-Terminus sind die wichtigsten Strukturen für die Aktivierung der G-Proteine (Hermans, 2003; Wong, 2003). Bei Aktivierung des Komplexes kommt es zu einer Konformationsänderung der dritten intrazellulären Schleife, die den Austausch von GDP zu GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins katalysiert. Dies führt zur Destabilisierung des Komplexes, und es kommt zur Dissoziation des G-Proteins in die $G\alpha$ -GTP und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten, die ihrerseits verschiedene Signalkaskaden aktivieren (Greasley et al., 2001; 2002; Pierce et al., 2002). Es gibt mehrere Subtypen der $G\alpha$ -Untereinheit dazu zählen $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_{12/13}$ und $G\alpha_q$ -Subtypen. Alle Subtypen regulieren bzw. aktivieren unterschiedliche Effektoren (Abb. 2). So aktivieren $G\alpha_s$ -Untereinheiten die Adenylylzyklasen (membrangebundenes Enzym) durch Stabilisierung ihrer aktiven Konformationen und führen somit zum Anstieg des intrazellulären cAMPs (zyklisches Adenosinmonophosphat). Demgegenüber inhibiert $G\alpha_i$ die Adenylylzyklase und sorgt für eine Abnahme der cAMP-Konzentration in der Zelle. Das cAMP wiederum führt zur Modulation der Proteinkinase A (PKA); über die Untereinheiten $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ koppelt der aktivierte Rezeptor somit an den PKA-Signalweg. $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten aktivieren Rho-GEF, die ihrerseits den Ras-Signalweg modulieren (Marinissen & Gutkind, 2001; Marinissen et al., 2001).

Die $G\alpha_q$ -Untereinheit moduliert die Phospholipase C (PLC), welche über Generierung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Ca^{2+}) aus endogenen Speichern und Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt (Abb. 2). Die $G\beta\gamma$ -Untereinheit ist genauso in der Lage, PKC zu modulieren, außerdem beeinflusst die Untereinheit nach Freisetzung aus dem heterotrimeren G-Protein den Influx von Ionen über Ionenkanäle (Abb. 2). PKA and PKC wiederum aktivieren mittels Phosphorylierung Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPKs), wie z.B. die extrazellulär regulierte Kinase (ERK), welche im Kern die Transkription von Zielgenen beeinflusst.

Die Inaktivierung der $G\alpha$ -GTP-Untereinheit passiert durch Hydrolyse des GTP mittels der intrinsischen GTPase Aktivität, was wieder zur Reassoziaton des trimeren G-Proteins führt.

An der Hydrolyse des GTPs sind RGS-Proteine (*regulator of G protein signalling*) beteiligt, die die Reaktion beschleunigen. Diese werden als GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) bezeichnet, wobei auch das Effektor-Protein selbst zu dieser Gruppe gehört (Ross & Wilkie, 2000).

Außerdem kann die Signalgebung des aktivierten GPCRs durch Phosphorylierung des Rezeptors über GPCR-Kinasen (GRKs) abgebrochen werden. Gleichzeitig führt die Assoziation des GPCR mit Arrestinen über *Clathrin coated pits* zur Internalisierung in Endosomen (Abb. 3).

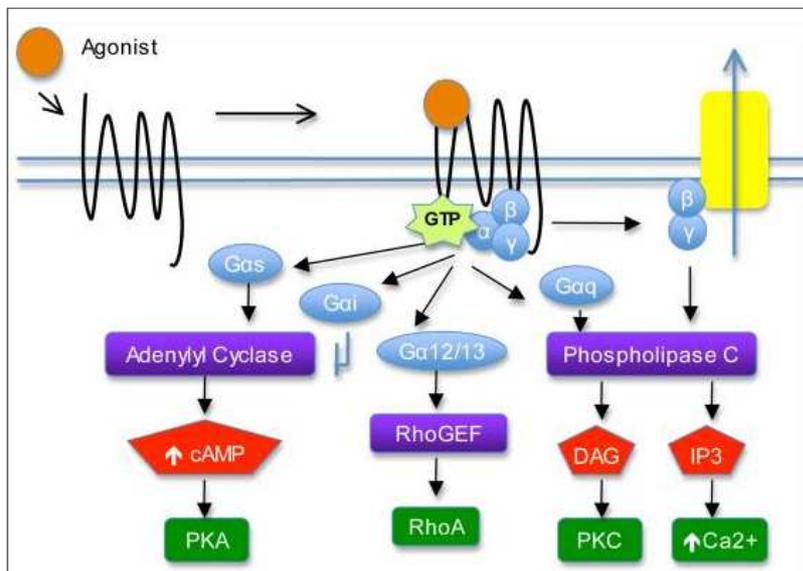


Abb. 2: Schematische Darstellung der möglichen G-Protein abhängigen Signaltransduktionswege nach GPCRs-Aktivierung.

(Nach Ritter & Hall, 2009).

PKC = Proteinkinase C,
DAG = Diacylglycerin;
IP3 = Inositol-1,4,5- trisphosphat,
RhoA: Ras homolog gene family member A, RhoGEF = Ras homolog Guanine Nukleotide Austauschfaktor,
PKA = Proteinkinase A,
cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat.

Es sind 21 G α , sechs G β und 12 G γ in Säugetieren bekannt. Diese können verschieden kombiniert werden und führen somit zu sehr vielen möglichen heterotrimeren G-Proteinen (Bockaert & Pin, 1999; Hildebrandt, 1997; Huber & Sakmar, 2011; Pierce et al., 2002; Sato et al., 2006). Diese Vielfalt an G-Proteinen lässt eine Feineinstellung über die jeweiligen aktivierten bzw. inhibierten Signalwege zu, hin zu resultierenden zellulären Funktionen. Somit kann die Aktivierung eines GPCRs in anderen Geweben bzw. Zellarten oder auch Differenzierungsstadien der Zellen zu verschiedenen Effekten führen. Die Spezifität eines Signals wird außerdem durch GPCR-Kinasen (GRKs) erreicht. Diese sind in der Lage, durch Phosphorylierungen eine aktive Form eines GPCRs zu stabilisieren und somit eine Abkopplung von G-Proteinen zu erzeugen, was zur Unterbrechung bzw. zur Verlangsamung der Signaltransduktionskaskade führt (Premont et al., 1995). Hinzu kommt noch ein G-Protein-unabhängiger Signalweg über Arrestine (Rajagopal et al., 2004), der die Feinabstimmung an Signalmöglichkeiten weiter erhöht. Neben anderen *scaffold* und Adaptor-Proteinen sind sieben unterschiedliche GRKs und vier Arrestine bekannt (Huber & Sakmar, 2011). GPCRs binden also eine Vielzahl an anderen Proteinen, die die Spezifität, Selektivität und den zeitlichen Ablauf des Signals eines GPCRs beeinflussen (Bockaert et al., 2003; Brady & Limbird, 2002; Devi, 2001; El Far & Betz, 2002; Foord & Marshall, 1999; Foord et al., 2005; Luttrell & Gesty-palmer, 2010; Maudsley et al., 2005; Ritter & Hall, 2009).

1.1.2.2 G-Protein-unabhängige Signalwege

Der schon im letzten Kapitel erwähnte, Arrestine involvierende Signalweg ist der am besten charakterisierte G-Protein-unabhängige Signalweg nach GPCR-Aktivierung (Abb. 3). Die kleine Familie der Arrestine sind GPCR-bindende Proteine, die ursprünglich im Zusammenhang mit der GPCR-Desensibilisierung entdeckt wurden (Ferguson, 2001; Luttrell, 2005). Durch Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren (AS) im C-Terminus des Rezeptors oder der dritten IZS über GPCR-Kinasen (GRKs) wird der G-Protein abhängige Signalweg unterbrochen und die Bindung von translozierenden Arrestinen aus dem Zytosol an die Plasmamembran ermöglicht (Ferguson, 2001; Stoffel et al., 1997). Die Assoziation des GPCR mit Arrestinen führt über Clathrin (schwarze Formen) und Clathrin-Adaptoren AP2 (grüne Kreise) zur Internalisierung des Rezeptors in Endosomen (Abb. 3) (Hanyaloglu & von Zastrow, 2008; Moore et al., 2007; Premont & Gainetdinov, 2007; Reiter & Lefkowitz, 2006). Nach Internalisierung werden die GPCRs zu Lysosomen transportiert, in denen sie degradiert werden, oder sie werden in Endosomen einem Recycling-Prozess unterzogen, der die funktionellen Rezeptoren wieder an die Zellmembran transportiert (Resensibilisierung). Die Rekrutierung von Arrestinen an den aktivierten GPCR kann neben der Internalisierung des GPCRs, welches den Prozess der Rezeptor-Desensibilisierung und Resensibilisierung reguliert, auch zur Initiation Arrestin vermittelter Signalkaskaden führen. Dazu gehört die Aktivierung der Mitogen aktivierenden Protein-Kinasen (MAPK); im speziellen zu erwähnen ist hier die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) (Luttrell, 1999; Tohgo et al., 2002). Arrestine sind in der Lage, auch katalytisch aktive Proteine in den Rezeptor-Arrestin-Komplex zu binden. Sie können so selbst als Liganden regulierende *scaffolds* die Rekrutierung von Protein und Lipid-Kinasen, Phosphatasen und die Ubiquitin-Ligasen-Aktivität beeinflussen (Luttrell & Gesty-palmer, 2010). Ein Arrestine gebundener GPCR ist unfähig, G-Proteine zu aktivieren. Dies führt dazu, dass die Bindung an Arrestine einen Umschalt punkt zwischen zwei separaten Signalkaskaden darstellt, dem G-Protein-abhängigen Signalweg, aktiviert durch Ligandenbindung, und dem Arrestin-abhängigen Signal, der mit der Desensibilisierung beginnt und übergeht in den Eintritt des endozytotischen Signalweges (Abb. 3) (Ritter & Hall, 2009).

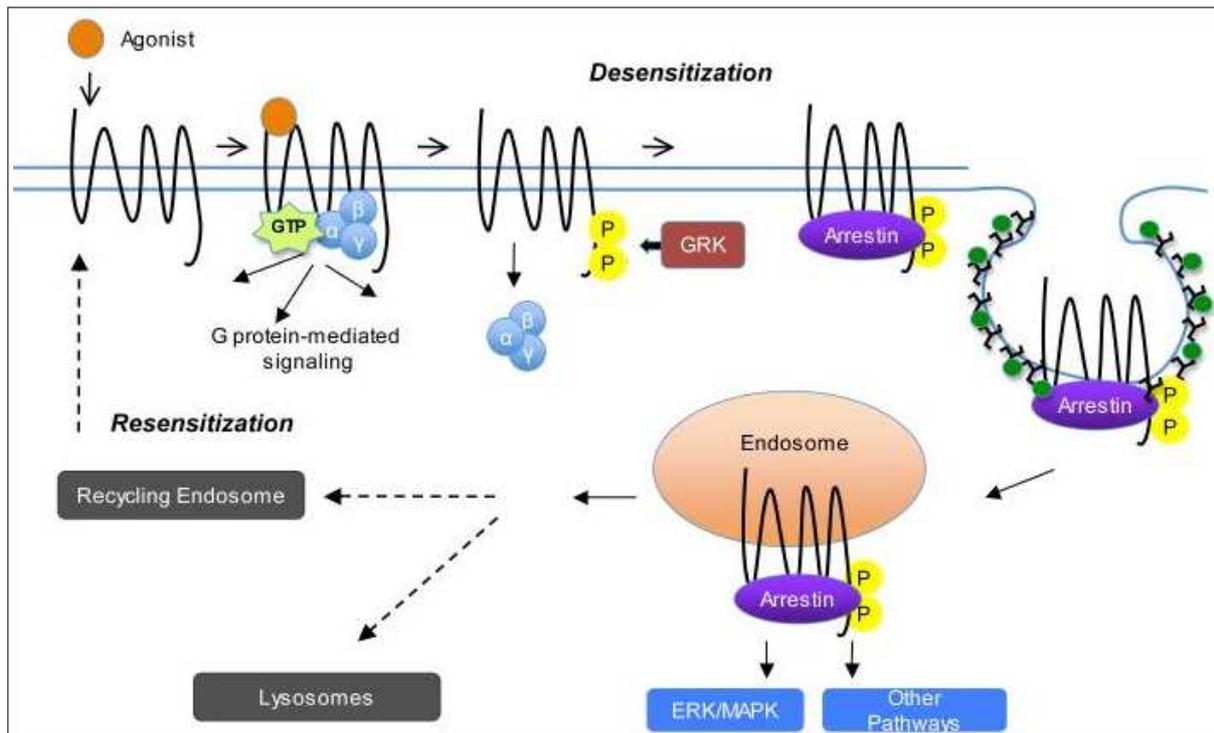


Abb. 3: Mögliche G-Protein-unabhängige Signaltransduktion und GPCR-Internalisierung.
(Nach Ritter & Hall, 2009) GRK: GPCR regulatorische Kinase, ERK: extrazellulär regulierte Kinase.

Es konnten Liganden charakterisiert werden, die entweder den G-Protein-abhängigen oder den Arrestin-vermittelten Signalweg bevorzugen (Ritter & Hall, 2009; Violin & Lefkowitz, 2007). Diese Eigenschaft der Liganden wird als “bias” bezeichnet. Die unterschiedliche Kopplung eines GPCRs an G-Protein-abhängige und Arrestin-induzierte Signalwege ist ein Mechanismus, der zu einem Liganden-induzierten Signal führt (Gesty-Palmer & Luttrell, 2008; Kenakin, 2002, 2007; Luttrell & Gesty-palmer, 2010; Maudsley et al., 2005; Violin & Lefkowitz, 2007).

1.2 GPCR-vermittelte Peptid-basierte Tumordiagnostik/ -therapie

Ein großes Potential für die moderne Tumormedizin liegt in der Identifizierung neuer tumorspezifischer Zielmoleküle. Diese Zielmoleküle (Targets) können für die Bindung von veränderten Molekülen (Leitstrukturen) verwendet werden. Diese Bindungsmoleküle (Leitstrukturen) können an ein signalgebendes oder therapeutisches Agens gekoppelt und über die Blutbahn dem betroffenen Patienten verabreicht werden. Dies gewährleistet eine gerichtete Strategie zur Tumordiagnostik/-therapie. Statt eines unspezifischen Kontrastmittels oder konventionellen Chemotherapeutikums ist es möglich, ein molekular gerichtetes zielsuchendes Kontrastmittel oder Medikament herzustellen, das sich im Tumorgewebe konzentriert.

GPCRs eignen sich sehr gut als Zielstrukturen in der Tumordiagnostik und -therapie durch die spezifische Bindung von Peptid-Liganden. Die Voraussetzung ist eine erhöhte Expression der Zielstruktur im Tumor im Vergleich zum umgebenden Normalgewebe. Es konnte in vielen Tumorzellen die Überexpression von Peptid bindenden GPCRs im Vergleich zum ursprünglichen

Normalgewebe nachgewiesen werden (Moody et al., 1996; Reubi & Landolt, 1984; Wada et al., 1991). Eine große Schwierigkeit bei peptid-basierten Diagnostika und Therapeutika liegt in der Stabilität der Peptide. Durch endogene Peptidasen, die ubiquitär zu finden sind, werden sie oft frühzeitig abgebaut. Eine Optimierung der Peptidsequenz kann die Stabilität oft verbessern (Bellmann-Sickert & Beck-Sickinger, 2010). Die Peptid-Liganden können durch Veränderung ihrer AS-Sequenz in ihrer Bindungsspezifität, Bindungseigenschaft, Stabilität und physiologischen Funktion verändert und somit für eine gerichtete Tumordiagnostik oder Therapie optimiert werden. Peptide eignen sich sehr gut für die Tumorthherapie und Diagnostik, da die meisten in niedermolekularen Bereichen wirken und eine gute Gewebegängigkeit besitzen. Da die meisten Peptide nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, sind sie zudem nebenwirkungsarm. Außerdem werden sie über das System der Leber schnell abgebaut und über die Nieren ausgeschieden, wobei keine toxischen Nebenprodukte anfallen. Die geringe Größe der Peptide führt dazu, dass diese nicht vom Immunsystem erkannt werden und somit keine oder nur wenig Nebenwirkungen zu erwarten sind. In Anbetracht zu gängigen Tumorthapien wie Chemotherapeutika und Bestrahlung, die auf die Zellen des gesamten Körpers wirken oder auf das umliegende Gewebe, ist eine gerichtete Tumorthherapie mit peptidischen Liganden von großem Vorteil.

Es kann hier unterschieden werden zwischen einer direkten Tumorthherapie, bei der die Ligandenbindung selbst zu einer Modulation der Signalwege in den Tumorzellen führt, und einer indirekten Therapievariante, in der der Ligand an zytotoxische Substanzen, Chemotherapeutika oder Radionukleotide gebunden wird, die dann die Tumorzelle angreifen ohne größere Nebenwirkungen auszulösen. Für die Diagnostik ist es möglich, die Liganden an Fluoreszenz-Farbstoffe zu koppeln oder radioaktiv zu markieren und nach Applikation mittels geeigneter Methoden wie der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sichtbar zu machen (Abb. 4). So ist es mit Peptidliganden möglich, Tumore und Metastasen vom Normalgewebe abzugrenzen, zu lokalisieren und zu diagnostizieren und zielgerichtete Therapien durchzuführen.

Ein Beispiel für die direkte Tumorthherapie mittels eines Peptids ist das Somatostatinrezeptor-System (SSTR). Neuroendokrine Tumore (NETs) des Pankreas und des Darms exprimieren verstärkt den SSTR2 (Reubi, 2007). Somatostatin inhibiert das Tumorstadium in SSTR positiven Tumoren (Ben-Shlomo et al., 2009; Moody et al., 2003; Schally, 1988). Für die klinische Anwendung wurde eine stabilisierte Somatostatin-Variante, das Octreotid, entwickelt, welche mit hoher Affinität nur an SSTR2 und SSTR5 bindet. Es wird unter dem Handelsnamen Sandostatin® vertrieben und zur systemischen Therapie des Hypersekretionssyndroms bei gastroenteropankreatischen Tumoren und neuroendokrinen Tumoren eingesetzt (Erem et al., 2004; Pessaux et al., 2006). Das Octreotid wird auch zur Tumordiagnostik angewendet. Dieses Verfahren trägt den Namen Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie oder Octroskan®. Hierbei wird das Octreotid über einen Komplexbildner mit ¹¹¹Indium markiert. Die Überexpression des Somatostatinrezeptors Typ 2 (SSTR2) in neuroendokrinen Tumoren

führt zur Anreicherung des radioaktiv markierten Peptidliganden in den Tumorzellen. Durch die radioaktive Markierung des Octreotids ist die zielgerichtete Diagnostik dieser Tumore und ihrer Metastasen mit einer PET-Untersuchung möglich (Abb. 4) (Delpassand et al., 2008; Reubi, 2007).

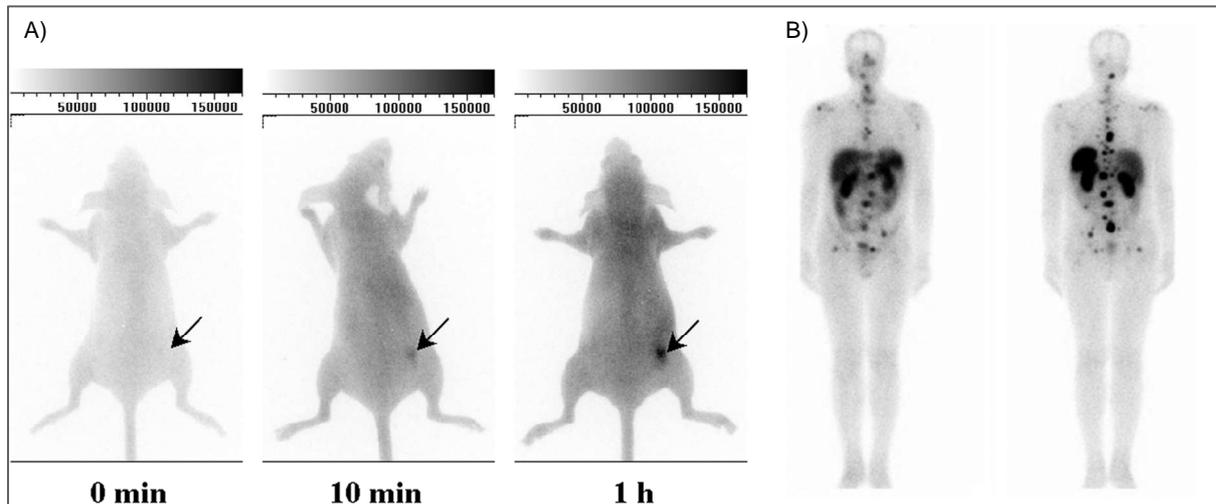


Abb. 4: Optische Bildgebung von Tumoren nach Applikation von fluoreszenzmarkiertem Octreotid bzw. Octreoscan®. A) *In vivo* Fluoreszenz-Bildgebung von RIN38 SSTR2 Tumor tragenden Nacktmäusen nach intravenöser Injektion in die Schwanzvene von indotricarbocyanine-octreotate (0.1 $\mu\text{mol kg}$) Der subkutane Tumor ist nach 1h deutlich zu detektieren (Grötzinger & Wiedenmann, 2004). B) Ganzkörper-PET-Scan eines 49 Jahre alten Mannes ein Jahr nach operativer Entnahme eines gastroenteropankreatischen Tumors (GEP-Tumor). 12 h Post-Applikation von Octreoscan®. Die Metastasen in den Knochen sind deutlich zu erkennen (Bombardieri et al., 2010).

Die optische Bildgebung (Abb. 4 A) mit Fluoreszenzfarbstoffen stellt nicht nur eine vielversprechende Technik in der präklinischen Forschung dar, sondern findet auch schon in der Klinik bei der Mikroendoskopie und Mammographie Anwendung. Darüber hinaus stellt die Nahinfrarot-(NIR-) Fluoreszenz-Bildgebung eine vielversprechende Technik dar, Tumorgewebe während Operationen sichtbar zu machen (Frangioni, 2008). Bei der Entfernung von Tumoren ist es für die Prognose des Patienten sehr entscheidend, dass alle Tumorzellen entfernt werden. Durch den Einsatz von intraoperativen-optischen Bildgebungstechniken würde die Unterscheidung zwischen Tumorzellen und normalem Gewebe erleichtert werden. Dies gewährleistet die vollständige Entfernung des Tumors und der Tumorzellen. Es werden Fluophore benutzt, die das Licht zwischen 650 und 900 nm emittieren. In diesem Bereich ist der Absorptionskoeffizient des Gewebes relativ gering und die unspezifische Autofluoreszenz des Gewebes minimal. Die Eindringtiefe wird dadurch erhöht und die Hintergrundfluoreszenz minimiert, was zu einem verbesserten und verstärkten Bildkontrast führt (Frangioni, 2008; Keereweer et al., 2012).

1.3 Orexinrezeptoren und Orexine

1.3.1 Entdeckung und Struktur

Die Orexinrezeptoren 1 und 2 (OXR) und deren Liganden Orexin A (OXA) und B (OXB) wurden 1998 aus dem Hypothalamus der Ratte isoliert (Sakurai et al., 1998; de Lecea, 1998). Diese bilden zusammen das orexinerge System. Beide Rezeptoren gehören zu der GPCR-Klasse A (Fredriksson et al. 2003). Die Gruppe um Sakurai konnte zeigen, dass intrazerebroventrikular (i.c.v) injiziertes Orexin (OX) die Nahrungsaufnahme stimuliert. Aus diesem Grund benannten sie die Neuropeptide nach dem griechischen Wort für Hunger (grch. *orexis* = *Hunger*) (Sakurai et al., 1998). Beide Liganden entstehen durch die proteolytische Spaltung eines Vorläuferproteins, das Präpro-Orexin (PPO) (Abb. 5) (Sakurai et al., 1998; de Lecea, 1998). PPO ist identisch mit dem Präpro-Hypocretin, das unabhängig von einer weiteren Arbeitsgruppe aus hypothalamusspezifischer mRNA kloniert wurde (de Lecea, 1998). Diese Gruppe benannte das Peptid Hypocretin aufgrund von Sequenzhomologie mit Secretin und der Isolation aus dem Hypothalamus.

Beide Liganden werden posttranslational modifiziert, dabei werden beide Peptide am C-Terminus amidiert. Das 33 Aminosäuren (AS) lange OXA bekommt einen N-terminalen Pyroglutamat-Rest (Pyr), welcher durch intramolekulare Zyklisierung des Glutaminylrestes entsteht (Lee et al., 1999). Des Weiteren enthält OXA zwei intramolekulare Disulfidbrücken (Cys⁶-Cys¹², Cys⁷-Cys¹⁴), was dazu führt, dass OXA (36 kDa) zyklisch vorliegt. Diese Cysteine fehlen dem 28 Aminosäuren (AS) langen OXB (29 kDa), so dass es eine lineare Struktur hat (Sakurai et al., 1998). Im Gegensatz zu OXB kann OXA die Blut-Hirn-Schranke durchqueren (Kastin & Akerstrom, 1999).

Die OXR1 und 2 besitzen zwei und drei Glykosylierungsstellen und sind etwa 48 kDa und 50 kDa groß. OXR sind hoch spezifisch für das Neuropeptid OX. Andere Neuropeptide haben keinen Einfluss auf die OXR (Holmqvist et al., 2001; Sakurai et al., 1998). Die GPCRs OXR1 und OXR2 zeigen untereinander eine 64-prozentige Sequenzhomologie (Sakurai et al., 1998). Die Rezeptoren sind hoch konserviert zwischen verschiedenen Spezies, so zeigen die OXR eine 95 % Sequenzhomologie von Ratte und Mensch (Sakurai et al., 1998). Beide Peptide binden mit der gleichen Affinität den OXR2, jedoch zeigt OXA eine 10-fach höhere Affinität zum OXR1 im Vergleich zum OXR2 (Abb. 5) (Kukkonen et al., 2002; Rouet-Benzineb et al., 2004; Sakurai et al., 1998). Dies spiegelt sich in der Aktivierung der Rezeptoren wider. Dabei zeigt OXA eine 10-fach stärkere Kalzium-Mobilisierung in Chinese hamster-ovary-(CHO-)Zellen (Ammoun et al., 2003; Holmqvist et al., 2002; Sakurai et al., 1998).

OXA weist eine 46-prozentige Homologie zu OXB auf (identische Aminosäuren sind in Abb. 5 grau unterlegt) (Sakurai et al., 1999).

Peptidoptimierungen verschiedener Arbeitsgruppen identifizierten das C-terminale Fragment 15-33 des OXA als kürzeste den OXR1 aktivierende Variante (Darker et al., 2001; Lang & Beck-Sickinger, 2006; Lang et al., 2004). Darüber hinaus wurden *small molecules* entwickelt, woraus unter anderem auch der erste selektive OXR1-Antagonist SB-334687 (Smart et al., 2001) und seit 2004 auch ein OXR2-Antagonist (McAtee et al., 2004) entstand.

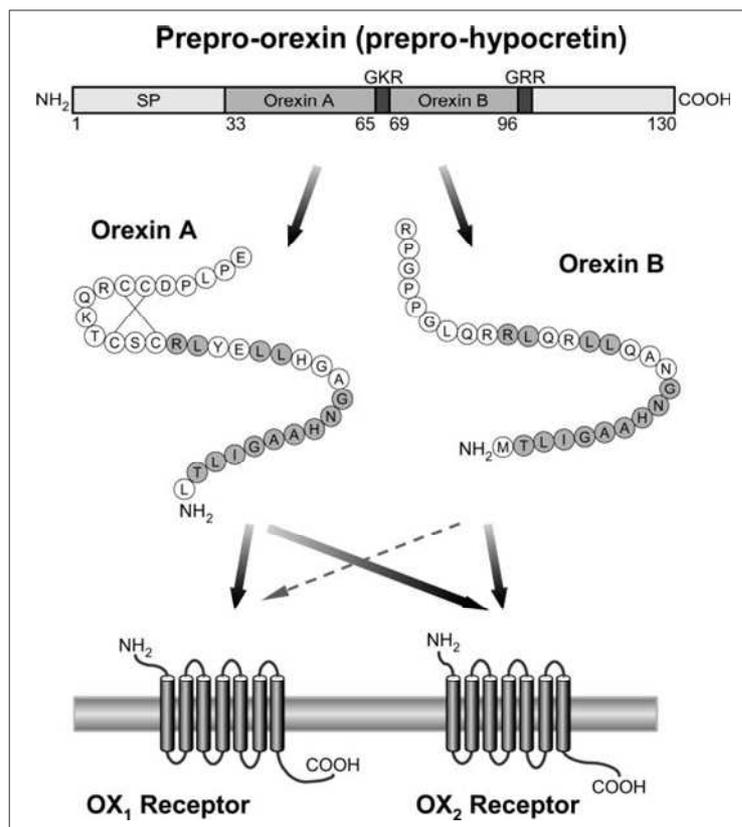


Abb. 5: Orexin-System: Rezeptoren und Liganden. (Nach Jöhren et al., 2004). Vereinfachte Struktur des PPO, Durch proteolytischen Spaltung entstehen das 33 AS lange OXA (Disulfidbrücke durch Striche angezeigt) und das 28 AS große OXB. Schematische Darstellung der Bindungsaffinitäten von OX an die beiden OXR. SP, Signal Peptid Sequenz; GKR und GRR, spezifische Erkennungsstellen für Prohormonkonvertasen.

1.3.2 Expressionsorte

Orexine und ihre Rezeptoren werden vor allem in hypothalamischen Neuronen exprimiert. Diese orexinergen- Neuronen projizieren vom Hypothalamus zu den Gebieten des zentralen Nervensystems (ZNS), die den Schlaf- und Wachrhythmus, neuroendokrine Homöostase und das Essverhalten regulieren und kontrollieren (Date et al., 1999; Gautvik et al., 1996; Peyron et al., 1998; Willie et al., 2003).

Die Expression der Rezeptoren und deren Liganden ist jedoch nicht nur auf das Gehirn beschränkt. Es konnten Expressionsorte in der Peripherie nachgewiesen und physiologischen Effekten zugeordnet werden (Voisin et al., 2003).

Kirchgessner und Liu beschrieben 1999 die Expression des OXA im Darm und Pankreas außerhalb des Gehirns. Das Vorhandensein von OXA im humanen Plasma wurde 2001 von zwei unabhängigen

Gruppen beschrieben (Arihara et al., 2001; Dalal et al., 2001). Dabei bleibt aber weiter die Frage offen, ob die Expressionsorte der OX in der Peripherie die Quelle für die Plasmakonzentration ist oder die Liganden lokal parakrin und oder autokrin wirken (Arihara et al., 2001; Jöhren et al., 2001; Ouedraogo et al., 2003).

Mittels RT-PCR (reverse transcriptase PCR) und Immunhistochemie (IHC) wurde die Expression des Rezeptors und deren Liganden in vielen verschiedenen peripheren Organen wie z.B. dem Pankreas, Niere, Dünndarm, Nebenniere, Gonaden und Fettgewebe (Blanco et al., 2002; Burdyga et al., 2003; Digby et al., 2006; Ehrström et al., 2005; Jöhren et al., 2001; Karteris et al., 2004; Kirchgessner & Liu, 1999; Nakabayashi et al., 2003a; Nanmoku et al., 2002; Randeva et al., 2001; Silveyra et al., 2007; Spinazzi et al., 2005; Takahashi et al., 2006; Ziolkowska et al., 2005) nachgewiesen.

Tab. 1 und 2 geben einen Überblick über die bisher nachgewiesenen Expressionsorte der Rezeptoren und deren Liganden im Menschen.

Tab. 1: Übersicht der Expression des OXR1 im Menschen.

PPO, präpro-Orexin; IHC, Immunhistochemie RT-PCR, reverse transcriptase PCR; ENS, enterisches Nervensystem; +, detektiert; –, nicht detektiert; ND, nicht untersucht.

Gewebe	Methode	OXR1	OXR2	Referenz	Kommentar
Nebennierenrinde	IHC (ABC)	+	-	Blanco et al. 2002	
	RT-PCR, WB, IHC	+	+	Spinazzi et al. 2005	
	RT-PCR, IHC	-	+	Randeva et al. 2001	
Nebennierenmark	IHC	-	+	Blanco et al. 2002	
Magen	IHC (IF)	+	-	Ehrstrom et al. 2005a	mukosale Epithelzellen
Dünndarm	IHC (IF)	+	+	Ehrstrom et al. 2005a	myenterischer Plexus, mukosale Epithelzellen, endokrine Zellen
	IHC (IF)	+	+	Kirchgessner and Liu 1999	ENS, myenterischer Plexus
Niere	RT-PCR, IHC (ABC)	+	+	Takahashi et al. 2006	Nierentubulus
Hoden	RT-PCR, IHC, WB	+	+	Karteris et al. 2004	
Penis und Nebenhoden	RT-PCR	+	+	Karteris et al. 2004	
Fettgewebe	RT-PCR, IHC	+	+	Digby et al. 2006	
Vagus Nerv	RT-PCR, IHC	+	+	Burdyga et al 2003	

Tab. 2: Übersicht der Expression der OX im Menschen.

PPO, präpro-Orexin; IHC, Immunohistochemie RT-PCR, reverse transcriptase PCR; ENS, enterisches Nervensystem; +, detektiert; -, nicht detektiert; ND, nicht untersucht.

Gewebe	Methode	OXA	OXB	PPO	Referenz	Kommentar
Nebennieren	RT-PCR	-	ND	+	Nakabayashi et al. 2003	
Magen	RT-PCR, IHC	+	ND	+	Nakabayashi et al. 2003	ENS, myenterischer Plexus, endokrine Zellen
	IHC (IF)	+	ND	ND	Ehrstrom et al. 2005a	neuronale Zellen in der Mukosa und im Ringmuskel, endokrine Zellen
Dünndarm	RT-PCR, IHC	+	ND	+	Nakabayashi et al. 2003	neuronale Zellen in der Mukosa der <i>lamina propria</i> und im Ringmuskel, myenterischer und submucosaler Plexus, endokrine Zellen
	IHC (IF)	+	+	+	Kirchgessner and Liu 1999	ENS, myenterischer Plexus
Dickdarm	IHC (IF)	+	ND	ND	Ehrstrom et al. 2005a	endokrine Zellen
	IHC	+	ND	+	Nakabayashi et al. 2003	ENS, myenterischer Plexus, endokrine Zellen kolorektale Epithelzellen
Pankreas	RT-PCR	ND	ND	+	Nakabayashi et al. 2003	
	IHC	+	ND	ND	Nakabayashi et al. 2003	α -Zellen
	IHC	+	ND	ND	Nakabayashi et al. 2003 Ehrstrom et al. 2005a	β -Zellen
	IHC	+	ND	ND	Nakabayashi et al. 2003	δ -Zellen
	IHC	+	ND	ND	Ehrstrom et al. 2005a	PP-Zellen
Niere	RT-PCR, IHC (ABC)	+	ND	ND	Takahashi et al. 2006	Nierentubulus
	RT-PCR, IHC	-	ND	+	Nakabayashi et al. 2003	
Penis und Nebenhoden	RT-PCR	ND	ND	+	Karteris et al. 2004	
Plazenta	RT-PCR, IHC	+	ND	+	Nakabayashi et al. 2003	

Darüber hinaus konnte die Expression der OXR auch in humanen Tumorgeweben nachgewiesen werden. Dazu konnte die Überexpression des OXR1 in humanen Nebennierenrindenadenomen im Vergleich zum Nebennieren Normalgewebe gezeigt werden (Blanco et al., 2002; Spinazzi et al., 2005). Hierbei zeigte sich eine proliferierende Wirkung von OXA auf die Tumorzellen (Spinazzi et al., 2005). Eine verstärkte Expression des OXR2 konnte mittels Immunhistochemie (IHC) in humanen Pheochromocytomen detektiert werden (Blanco et al., 2002).

Weitere Hinweise auf die Expression der OXR in Tumoren geben die Expression des OXR1 in humanen Tumorzelllinien. So konnte in Neuroblastom-Zelllinien (SK-N-MC) und in diversen humanen kolorektalen Tumorzelllinien wie z.B. HT-29, Caco2, SW480, SW620, LoVo und anderen eine OXR1-Expression nachgewiesen werden. In den humanen kolorektalen Tumorzelllinien konnte zudem die Induktion der Apoptose mittels OXA über den OXR1 ausgelöst werden (Ammoun et al., 2006; Laburthe et al., 2010; Rouet-Benzineb et al., 2004; Voisin, 2006; Voisin et al., 2011; Voisin et al., 2008). Die neuesten Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigen eine Expression des OXR1 in humanen kolorektalen Tumorgeweben und Lebermetastasen (Voisin et al., 2011).

1.3.3 OXR1-vermittelte Effekte

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration

In den meisten Arbeiten wurde in rekombinant exprimierenden Zellen nach Ligandenbindung an den OXR1 und OXR2 eine Kalziummobilisierung beobachtet (Ammoun et al., 2006; Holmqvist et al., 2001; Lund et al., 2000; Okumura et al., 2001; Sakurai et al., 1998; Smart et al., 1999). Dies weist darauf hin, dass der OXR1 hauptsächlich über das $G\alpha_q$ -Protein an den IP_3 -Signalweg gekoppelt ist. Es konnte relativ früh gezeigt werden, dass die Erhöhung der Kalziumkonzentration über zwei Wege vermittelt wird: Neben einer Mobilisierung von Kalziumionen aus den intrazellulären Speichern durch Aktivierung der $PLC\beta$, erfolgt ein Einstrom aus dem Extrazellularraum über Ionenkanäle (Johansson et al., 2007; Lund et al., 2000; Smart et al., 1999). Bei einer geringen Ligandenkonzentration kommt es zu einem Einstrom von Kalziumionen über rezeptorabhängige Ionenkanäle (Influx). Diese Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt zur Aktivierung der $PLC\beta$, die wiederum zur Mobilisierung von Kalziumionen aus den intrazellulären Speichern führt (Åkerman und Kukkonen, 2001; Larsson et al., 2005; Lund et al., 2000).

Der Kalziuminflux über rezeptorabhängige Ionenkanäle nach OXR-Aktivierung ist verantwortlich für eine Phosphorylierung von ERK (Ammoun et al., 2006a) und für die Aarachidon-Säure-Ausschüttung (Turunen et al., 2010). Hohe OXA-Konzentrationen führen zu einer $PLC\beta$ -Aktivierung und einer Mobilisierung der Kalziumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), unabhängig von einem Kalziuminflux (Åkerman und Kukkonen, 2001; Lund et al., 2000).

Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, ausgelöst über den endogenen OXR2, wurde in humanen adrenocorticalen H295R-Zellen nach OXA-Inkubation nachgewiesen. Der Kalziumanstieg war gekoppelt an die Phosphorylierung von ERK1/2, die durch eine $PKC\beta$ - und teilweise PKA -Inhibierung unterdrückt werden konnte (Wenzel et al., 2009).

Einfluss auf die Adenylylzyklase

Darüber hinaus gibt es Untersuchungen, die eine Aktivität der Adenylylzyklase nach OXR-Stimulation zeigen. Karteris zeigte 2001 das erste Mal das Vorhandensein funktioneller OXR außerhalb des ZNS. Dabei konnte er in der humanen fetalen Nebenniere die Expression des OXR2 nachweisen, der nach Aktivierung mit OXA an $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ koppelte (Karteris, 2001). In folgenden Arbeiten der gleichen Arbeitsgruppe wurde eine Abhängigkeit der OXR-Expression und der Signalweiterleitung vom metabolischen Status in Ratten gezeigt. Hungernde Ratten zeigten eine Reduzierung aller G-Proteine außer $G\alpha_i$, eine minimale Antwort der cAMP-Produktion aber keine IP_3 -Antwort auf OXA-Applikation in der Nebennierenrinde. Außerdem wurde eine cAMP-vermittelte Stimulierung der Glucocorticoid-Ausschüttung in humanen und -adrenocorticalen Zellen von Ratten nach OXA-Applikation nachgewiesen (Karteris & Randeva, 2003; Karteris et al., 2005; Ziolkowska et al., 2005).

Im Allgemeinen zeigen die Untersuchungsergebnisse verschiedener Forschungsgruppen, dass die OXA induzierte Stimulierung der Sekretion von Nebennierenhormonen über die Aktivierung der Adenylylzyklase und somit $G\alpha_i$ und $G\alpha_s$ gekoppelt ist (Kagerer & Jöhren, 2010).

Holmqvist *et al.* konnte 2005 einen dualen Effekt der OXR1-Aktivierung auf die cAMP-Synthese zeigen. In rekombinanten CHO-Zellen konnte nach Stimulation mit OXA eine geringe Reduzierung des cAMP-Spiegels mit einer EC_{50} von 1 nM und eine starke stimulierende Wirkung mit einer EC_{50} von 300 nM beobachtet werden. Diese Inhibition des cAMP-Spiegels konnte mittels des Pertussis Toxins aufgehoben werden, was auf die Beteiligung von $G\alpha_i$ -Proteine schließen lässt (Holmqvist *et al.*, 2005).

Internalisierung des Rezeptors

Eine indirekte Internalisierung des OXR1 nach OXA-Applikation wurde mittels GFP markiertem β -Arrestin 1 und 2 an stabil mit dem OXR1 transfizierten CHO-Zellen gezeigt. Hierbei zeigte sich eine schnelle (zwei Minuten) Translokation des β -Arrestins 1 und 2 vom Zytoplasma zur Plasmamembran. Nach einer Stunde konnte die Internalisierung des Arrestins in vesikulären Strukturen detektiert werden. Dies, in Zusammenhang mit einer Kolo-kalisation mit markierten OXA und die Verdrängung der Reaktion mittels eines OXR-Antagonisten, bestätigt, dass hier die Internalisierung des OXR1 indirekt beobachtet wurde (Evans *et al.*, 2001). Mittels verkürztem OXR1 konnte in Hek293T-Zellen gezeigt werden, dass eine Gruppe von Hydroxyl AS im C-Terminus des Rezeptors verantwortlich ist für die Interaktion mit β -Arrestin 2, was wiederum zu einer Internalisierung der beiden Proteine führt (Milasta *et al.*, 2005). Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte die Heterodimerisierung des Cannabinoid-Rezeptors 1 (CB1) und des OXR1 und die gemeinsame Internalisierung beider Rezeptoren (Ellis *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2011a).

Einfluss auf andere Signalwege

MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)

Weitere Untersuchungen an rekombinanten Zellsystemen weisen einen Einfluss der OXR1-Aktivierung auf MAPK nach. So konnte eine Phosphorylierung von ERK1 nach OXR1-Aktivierung in CHO-Zellen gezeigt werden (Ammoun *et al.*, 2006; Hilairet *et al.*, 2003), wobei hier eine zentrale Rolle dem Kalziumioneninflux aus dem Extrazellularraum zugeschrieben wurde. Ammoun *et al.* konnte 2006 eine OXR1 induzierte p38-Aktivierung nachweisen, die zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt.

In adrenocortikalen Rattenzellen wurde ein proliferierender Effekt von OXA über die Aktivierung der endogenen OXR, vermittelt über die MAPK p42/p44 (ERK1/2) und p38-Signalkaskade, nachgewiesen (Spinazzi *et al.*, 2005).

In rekombinanten Hek293T-Zellen konnte die Phosphorylierung von ERK1/2 mit einer β -Arrestin-Rekrutierung und Internalisierung des Rezeptors beobachtet werden (Milasta *et al.*, 2005).

Untersuchungen an humanen pluripotenten Nebennieren-H295R-Zellen zeigten eine ERK1/2 und p38-Aktivierung. Dabei wurde die ERK-Phosphorylierung hauptsächlich über $G\alpha_q$ und $G\alpha_s$ vermittelt, p38 wurde über $G\alpha_i$ aktiviert (Ramanjaneya et al., 2008; Ramanjaneya et al., 2009; Wenzel et al., 2009). Eine weitere Funktion von OXA, die über p38 vermittelt wird, ist die Auslösung des Differenzierungsprogramms in mesenchymalen Vorläufer-Stammzellen, embryonalen Fibroblasten und Adipozyten (Digby et al., 2006; Sellayah et al., 2011).

Phospholipase D (PLD)

Die Arbeitsgruppe um Kukkonen konnte 2008 in rekombinanten CHO-Zellen nachweisen, dass auch die PLD ein Zielmolekül in der Orexin-Signaltransduktion ist. Die Arbeit dieser Arbeitsgruppe zeigte die Aktivierung einer PLD und zwei PLCs, die bei niedrigen OXA-Konzentrationen zu einer Herstellung der Lipid-Mediatoren DAG und PA (phosphatidic acid) führten (Johansson et al., 2008). Die neuesten Ergebnisse zeigen eine PLD1-Aktivierung in Zusammenhang mit PKC δ (Jäntti et al., 2011). Auch eine OXR1 induzierte Aarachidonsäure-Ausschüttung, vermittelt über Phospholipase A (PLA) bei geringen OXA-Konzentrationen, wurde beschrieben. Bei der PLA-Aktivierung zeigte sich eine ERK-Involvierung und keine PKC (Turunen et al., 2010).

Einfluss auf Proliferation und Apoptose

Wie oben beschrieben gibt es Untersuchungen, die eine Aktivierung der MAPK über den OXR zeigen. MAPK sind an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Zelltod beteiligt, demzufolge wurde die Wirkung von OX daraufhin untersucht. Es wurde ein apoptoseinduzierender Effekt von OXA und B auf native OXR1 in humanen Kolonkarzinom- und Neuroblastom-Zelllinien bzw. auf native OXR2 in einer pankreatischen Ratten-Zelllinie beschrieben (Laburthe et al., 2010; Rouet-Benzineb et al., 2004; Voisin, 2006; Voisin et al., 2011, 2008). Die Apoptosinduktion ist vermittelt über ein im OXR1 vorhandenes *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM). Die Cytochrome C vermittelte mitochondriale Apoptose beruht auf der Rekrutierung der SHP-2-Phosphatase über das aktivierte $G\alpha_q$ -Protein, scheint jedoch unabhängig von einer PLC-Aktivierung zu sein (Laburthe et al., 2010; Voisin et al., 2008). Neben der Induktion von Apoptose in kolorektalen Tumorzelllinien konnte die Gruppe in neuesten Untersuchungen eine Inhibition des Tumorwachstums in subkutanen Xenografts zeigen (Voisin et al., 2011).

In einem Diabetes-Ratten-Modell wurde eine vermehrte Anzahl an pankreatischen Inselzellen detektiert, die OXR1 und Caspase-3-Expression zeigten. Dies könnte ein Hinweis auf die Aktivierung apoptotischer Signalwege durch OX in an Diabetes leidenden Ratten sein (Adeghate et al., 2010).

Ein proliferierender Effekt von OX wurde in Adipozyten, humanen und adrenocortikalen Rattenzellen gezeigt (Digby et al., 2006; Skrzypski et al., 2011; Ziolkowska et al., 2005; Zwirski-Korczała et al., 2007). Dabei scheint der OXR1 einen eher proliferierenden Effekt zu vermitteln, und der OXR2

induziert eine Repression der Proliferation (Malendowicz et al., 2001; Spinazzi et al., 2005; Ziolkowska, et al., 2005; Zwiriska-Korczała et al., 2007).

Das Profil der über OXR ausgelösten Signale ist sehr vielfältig. Die Aktivierung der OXR kann sowohl über $G\alpha_q$ -, $G\alpha_i$ - als auch über $G\alpha_s$ -Proteine an unterschiedliche Signalkaskaden gekoppelt sein. Dabei bleiben die Art der Kopplung und die anschließende Signalkaskade von der Ligandenkonzentration, Dimerisierung des Rezeptors, von dem metabolischen Status und Gewebe- und Zelltyp abhängig.

1.3.4 Physiologische Funktionen

Die am besten untersuchten systemischen Effekte des orexinergen Systems sind der Appetit-stimulierende Effekt der Orexine (Sakurai et al., 1998) und, durch Hara et al. 2001 das erste Mal gezeigt, die Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus (Hara et al., 2001). OX sind außerdem in der Lage, eine Erhöhung des Blutdrucks (Samson et al., 1999) und der Herz- und Atemfrequenz (Shirasaka et al., 1999) im Rahmen der Stress- und Abwehrreaktion zu vermitteln (Abb. 6).

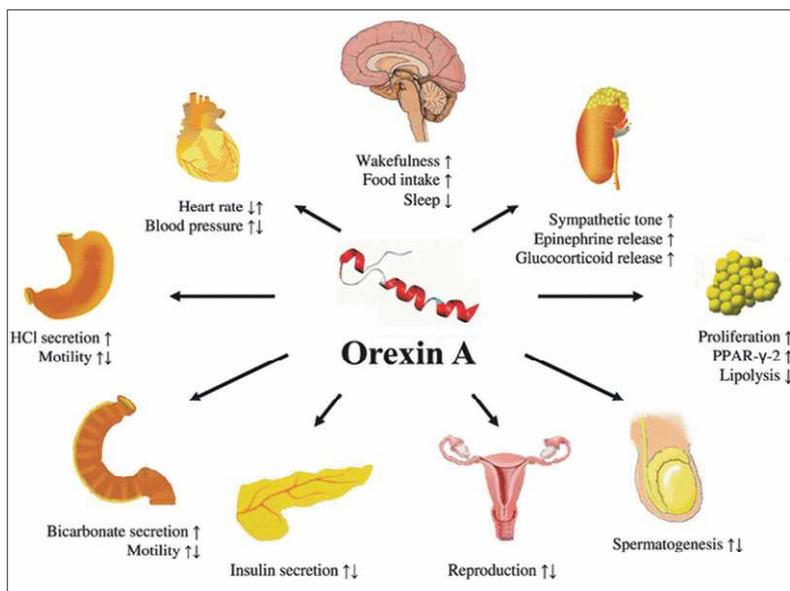


Abb. 6: Funktion von Orexin.

(nach Heinonen et al., 2008).

Die bekanntesten Effekte von Orexin sind die Beeinflussung des Schlaf-Wach-Rhythmus und der Nahrungsaufnahme. Orexine wirken außerdem auf die Motilität und die Sekretion im GIT, regulieren die Hormonproduktion und Freisetzung aus der Nebennierenrinde, sind involviert in der Regulation des Metabolischen Status und der Adipozytenproliferation, können eine Veränderung des Blutdruckes und der Herzfrequenz vermitteln und beeinflussen darüber hinaus die Reproduktion und Spermatogenese.

In verschiedenen Arbeiten konnte ein Effekt von OX auf die Regulation der gastrointestinalen Motilität gezeigt werden (Kirchgessner und Liu, 1999). Eine Stimulation der Sekretion von Salzsäure (HCL) im Magen und die Bikarbonat-Sekretion im Dünndarm konnten mittels der OXR1-Aktivierung induziert werden (Bengtsson et al., 2007; Okumura et al., 2001; Takahashi et al., 1999). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Magensäuresekretion über vagale Signalwege gesteuert wird, wohingegen die OXA vermittelte Bikarbonatsekretion im Darm unabhängig von vagalen Efferenzen war (Bengtsson et al., 2007).

OXA wurde im humanen Inselzellen des Pankreas detektiert (Nakabayashi et al. 2003; Kirchgessner and Liu, 1999; Ehrström et al., 2005; Heinonen et al., 2008). Nakabayashi et al zeigte 2003 eine

Kolokalisation von OXA und Insulin produzierenden β -Zellen. Ehrström konnte hingegen 2005 OXA Immureaktivität in nur einigen endokrinen β -Zellen und wenigen pankreatisches Polypeptid (PP) produzierenden Zellen nachweisen. Der Einfluss von OXA auf die Glucose Homöostase durch eine Regulation der Sekretion pankreatischer Hormone bleibt noch weiter zu untersuchen. Es konnte noch keine klare Rolle des Peptids gezeigt werden. Die Untersuchungsergebnisse hierzu führten zu unterschiedlichen und zum Teil gegensätzlichen Aussagen. Eine intravenöse Gabe von OXA in hungernden Menschen führte zu einem geringen aber signifikanten Anstieg der Insulinkonzentration (Ehrström et al., 2005). Dagegen zeigte die gleiche Arbeitsgruppe eine Reduktion der Plasma-Glukagon-Konzentration während der Infusion von OXA in Ratten, wobei die Insulinkonzentration hier unverändert blieb (Ehrstrom, 2004). Eine Reduktion der Insulinsekretion aus isolierten Ratteninselzellen nach OXA-Induktion zeigte Quedraogo et al. 2003. In den neuesten Untersuchungen wurde die Expression des OXR1 kolokalisiert mit Insulin und Glukagon in pankreatischen Inselzellen von Ratten. Hierbei zeigte sich eine verstärkte Expression des OXR1 in Glukagon positiven Zellen nach einer Diabetes-Typ-1-Auslösung in Ratten (Adeghate et al., 2010).

Eine Regulation der Hormonproduktion und der Freisetzung aus der Nebennierenrinde wurde zunächst durch die intrazerebroventrikuläre Gabe von OX untersucht, welche die Konzentration von Corticosteron (Hagan et al., 1999; Malendowicz et al., 1999) erhöhte. Die Untersuchungsergebnisse verschiedenster Forschungsgruppen, zeigten in Ratten, in humanen Nebennierengeweben und in adrenocortikalen Zellen eine OXA induzierte Stimulierung der Sekretion von Nebennierenhormonen (Kagerer & Jöhren, 2010; Karteris & Randeva, 2003; Karteris et al., 2005; Wenzel et al., 2009; Ziolkowska et al., 2005).

Weiter wurden OXR in Adipozyten nachgewiesen, wobei OXA eine proliferierende Wirkung zeigte, aber einen inhibierenden Einfluss auf die Adipogenese und die Lipolyse hat (Digby et al., 2006; Skrzypski et al., 2011).

Zudem wurde die Expression der OXR in humanen Hoden und Ovarien detektiert und weiter untersucht, was zu der Annahme führt, dass die Rezeptoren eine Funktion in der Reproduktion haben (Jöhren et al., 2001; Karteris, 2004; Silveyra et al., 2007). Die Expression von OXR auf hämatopoetischen CD34+ Stamm- und Vorläuferzellen lässt vermuten, dass das blutbildende System ein weiteres System ist, das durch OX beeinflusst werden kann (Steidl et al., 2004). OX stimuliert die Aktivität des *hypoxia-inducible factor-1* (Hif1 α) (Sikder & Kodadek, 2007). Hif1 α ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Stimulation der Angiogenese in Tumoren diskutiert wird. Ein proangiogener Effekt von OXA konnte in humanen Endothelzellen (HUVECs) nachgewiesen werden. Die Aktivierung der nativen OXR1 mit OXA in HUVECs führt über die Phosphorylierung von ERK zur Stimulierung der Angiogenese (Kim et al., 2010).

1.4 Ösophaguskarzinome

Ösophagustumore sind die sechst häufigste Todesursache weltweit (Kamangar et al. 2006; Schuchert et al., 2010). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 5 und 16 % und ist stark abhängig vom Differenzierungsgrad bei Diagnosestellung (Kamangar et al., 2006; Schuchert et al., 2010). Die schlechte Überlebensrate resultiert aus den mangelnden und unzureichenden Diagnostikmöglichkeiten zur Tumorerkennung und am zunächst beschwerdefreien Verlauf in den frühen Erkrankungsstadien. So sind die meisten Tumore bei Diagnosestellung schon lokal fortgeschritten oder metastasiert. (Schuchert et al., 2010).

Es lassen sich zwei histologische Subtypen des ösophagealen Karzinoms unterscheiden: das eher im oberen bis mittlerem Teil des Ösophagus auftretende Plattenepithelkarzinom und das vorwiegend im unteren Abschnitt entstehende Adenokarzinom, dessen Inzidenz zurzeit zunimmt (Cook et al., 2009).

Die Plattenepithelkarzinome, die noch die häufigere Krebsart im Ösophagus darstellen (Koshy et al. 2004), werden durch die unregulierte Proliferation des Plattenepithels nach genetischer Veränderung, z.B. dem Verlorengehen der DNA-Reparaturmechanismen, hervorgerufen. Risikofaktoren stellen exzessiver Alkoholgenuss und das Rauchen von Tabak dar (Lagergren & Lagergren, 2010; Schuchert et al., 2010). Durch die verstärkte Proliferation des Plattenepithels der Mucosa entwickelt sich über Dysplasien des Gewebes ein *Carcinoma in situ* (CIS) bis hin zum invasiven und metastasierenden Karzinom. In 30 % bis 70 % der resektierten Patienten sind Metastasen in den umliegenden Lymphknoten zu finden, was direkt korreliert mit der Invasionstiefe des Tumors (T) und dies wiederum mit der Überlebensrate (Schuchert et al., 2010)

Das Adenokarzinom entsteht aus einem Barrett-Ösophagus, einer Schleimhautumwandlung am Übergang zum Magen. In den letzten Jahren konnte eine starke Zunahme des Adenokarzinoms in westlichen Industrienationen nachgewiesen werden. Der Hauptrisikofaktor des Adenokarzinoms sind vor allem die gastroösophageale Refluxkrankheit und Übergewicht (Freedman et al., 2007; Lagergren & Lagergren, 2010; Schuchert et al., 2010).

Die Diagnose wird meist durch eine Endoskopie mit Biopsie-Entnahme gestellt. Die Bestimmung des Stadiums erfolgt meist über Computertomographie (CT), Sonographie und PET (Positronen-Emissions-Tomographie).

Nach der Diagnose eines ösophagealen Tumors wird der Tumor klassifiziert, wobei der Tumor einem Stadium zugeordnet wird (*Staging*). Dies ist ausschlaggebend für die weitere Therapie und erlaubt eine Prognose-Abschätzung. Wie schon erwähnt, ist die Überlebensrate eng korreliert mit dem Stadium des Tumors (Schuchert et al., 2010).

Die Eingruppierung der Tumore in Stadien wird auf Grundlage des TNM- (*Tumor-node-metastasis*) Systems und des Tumorgrades (*Grading*) vorgenommen (Abb. 7 und Tab. 3). Das zurzeit angewendete TNM-System beruht auf der siebten Edition des AJCC/UICC *TNM Staging Systems*, welches 2010 angepasst wurde (Edge & Compton, 2010). Die TNM-Klassifizierung beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors (T), die Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und eine eventuelle Fernmetastasierung (M). Die Ausdehnung des Primärtumors wird mit T1 bis T4 beschrieben (Abb. 7), N und M beschreiben das Fehlen (N0/M0) oder das Vorhandensein (N1-N3/M1) von Lymphknotenmetastasen bzw. Fernmetastasen.

Der Tumorgrad (*Grading*) gibt Auskunft über den Grad der histologischen Dedifferenzierung der Tumorzellen. Dabei werden die Tumorzellen nach histologischen und zytologischen Gesichtspunkten in niedrig maligne (G1 = gut differenziert), mittelgradig maligne (G2 = mäßig differenziert) und hoch maligne (G3 = gering differenziert) eingeordnet.

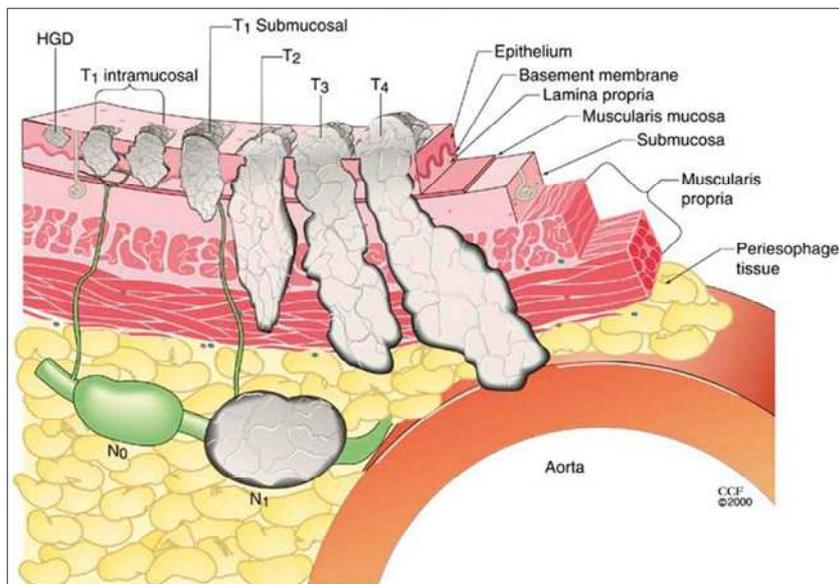


Abb. 7: Ausdehnung des Primärtumors (T).

HGD (*high-grade dysplasia*);

T1: Tumor wächst in die *Lamina propria* (T1a) oder *submucosa* (T1b) ein;

T2: Tumor dringt in die *muscularis propria* ein;

T3: Tumor wächst in das Bindegewebe ein;

T4: Tumor dringt in angrenzende Strukturen ein.

(http://www.clevelandclinicmed.com/medicalpubs/disease-management/hematology-oncology/esophageal-cancer/images/esophageal-cancerfig2_large.jpg)

Die Einordnung in die verschiedenen Stadien wird für Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus separat vorgenommen (Schuchert et al., 2010).

Tab. 3: Stadieneinteilung der ösophagealen Tumore nach AJCC/UICC, aufbauend auf der TNM-Klassifizierung.

Stage	Plattenepithelkarzinome				Adenokarzinome			
	T	N	M	Grade	T	N	M	Grade
Stage 0	Tis (HGS)	N0	M0	1	Tis (HGS)	N0	M0	1
Stage IA	T1	N0	M0	1	T1	N0	M0	1-2
Stage IB	T1 T2-3	N0 N0	M0 M0	2-3 1	T1 T2	N0 N0	M0 M0	3 1-2
Stage IIA	T2-3 T2-3	N0 N0	M0 M0	1 2-3	T2	N0	M0	3
Stage IIB	T2-3 T1-2	N0 N1	M0 M0	2-3 Jedes G	T3 T1-2	N0 N1	M0 M0	Jedes G Jedes G
Stage IIIA	T1-2 T3 T4a	N2 N1 N0	M0 M0 M0	Jedes G Jedes G Jedes G	T1-2 T3 T4a	N2 N1 N0	M0 M0 M0	Jedes G Jedes G Jedes G
Stage IIIB	T3	N2	M0	Jedes G	T3	N2	M0	Jedes G
Stage IIIC	T4a T4b Jedes T	N1-2 Jedes N N3	M0 M0 M0	Jedes G Jedes G Jedes G	T4a T4b Jedes T	N1-2 Jedes N N3	M0 M0 M0	Jedes G Jedes G Jedes G
Stage IV	Jedes T	Jedes N	M1	Jedes G	Jedes T	Jedes N	M1	Jedes G

Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass die Entwicklung innovativer Diagnostik- und Therapieverfahren für Tumore des Ösophagus von essentieller Bedeutung ist. Neben einer Früherkennung, die aufgrund des symptomfreien Verlaufes der frühen Erkrankungsstadien schwer zu gewährleisten ist, kann eine gerichtete Therapie der schon fortgeschrittenen Tumore zu höheren Überlebensraten führen. Das Tumortargeting mit Peptidliganden repräsentiert eine Strategie zu dieser zielgerichteten Therapie und Metastasendetektion bei schon fortgeschrittenen Stadien. Dabei kann eine gerichtete Therapie durch die Kopplung der Peptidliganden mit einem β -Strahler erfolgen.

1.5 Ziel der Arbeit

Die frühe Diagnostik gefolgt von einer zielgerichteten Therapie von Tumoren und Metastasen ist der entscheidende Schritt für eine verbesserte Überlebensrate. Genauso entscheidend ist es während der Resektion des Tumors das gesamte dedifferenzierte Gewebe zu entfernen und somit ein Rezidiv und anschließende Metastasierung zu verhindern. Die Möglichkeit einer gerichteten minimal invasiven Tumordiagnostik ist hier wünschenswert. Das Tumortargeting mit Peptidliganden repräsentiert eine Strategie zur verbesserten Diagnostik und einer gerichteten Therapie von Tumoren. Geeignete Zielstrukturen für diesen Ansatz zeigen eine im Tumor verstärkte Expression und führen somit zu einer vermehrten Bindung von Leitstrukturen (Peptidliganden), die an ein signalgebendes oder therapeutisches Agens gekoppelt werden. Somit werden gezielt nur die Tumorzellen detektiert bzw. therapiert und nicht die gesunden Zellen. Als Zielstrukturen bieten sich besonders die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) an, da sie an der Zellmembran lokalisiert sind und die meisten Peptidliganden binden, welche relativ einfach optimiert und gekoppelt werden können. Einer dieser GPCR stellt der Orexinrezeptor 1 (OXR1) dar.

In vorliegender Arbeit sollte das Potenzial des OXR1 als Tumortarget in humanen gastrointestinalen Tumoren untersucht werden. Dazu sollte zum einen i) eine detaillierte Expressionsanalyse des Rezeptors erstellt werden und ii) funktionelle Fragestellungen hinsichtlich der OXR1-vermittelter Effekte beantwortet werden.

Dazu sollte als erstes die Expression des Rezeptors an humanen gastrointestinalen Gewebeschnitten (Tumor- *versus* Normalgewebe) untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Frage geklärt werden, ob die OXR-Expressionsstärke mit dem Stadium der Krankheit des Patienten korreliert. Anhand der ermittelten Expressionsdaten und der somit identifizierten und geeigneten Tumorentitäten, sollte im Anschluss eine entsprechend geeignete humane Tumorzelllinie gefunden werden, die endogen den OXR1 exprimiert, um die Grundlage für ein geeignetes *in vivo* Tumormodell zur Anwendung in der fluoreszenzbasierten Bildgebung zu schaffen. Um im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Frage der physiologischen Rolle des Rezeptors in den Tumorzellen zu beantworten sollten humane, den OXR1 endogen exprimierende Tumorzelllinien, als Modellorganismen dienen. Diese sollten zum Einen auf OXA-induzierte zelluläre Effekte, wie die Veränderung des Wachstumsverhalten untersucht werden was einen möglichen Einsatz des Liganden als direktes wachstumshemmendes Therapeutikum zeigen würde. Zum Anderen sollten die Tumorzelllinien auf OXR1-vermittelte-Signaltransduktionswege einschließlich der Kalziummobilisierung, die Beeinflussung des cAMP-Spiegels und das Internalisierungsverhalten, untersucht werden.

Somit sollte die grundlegende Eignung der Zielstruktur für die Tumordiagnostik und -therapie untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Apparate und Geräte

2100 Bioanalyzer	Agilent, Palo Alto (USA)
BIND® Reader	SRU Biosystems, Woburn (USA)
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
CellCelector	Aviso, Jena
CellLux, Cellular Imaging System	Perkin Elmer, Waltham (USA)
DNA-Agarosegel-Systeme	Peqlab, Erlangen
Dispergierstation T8.10	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Einfrühbehälter für die Zellkultur „Mr.Frosty“	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
EnVision 2103 Multilabel Reader	Perkin Elmer, Waltham (USA)
FACSCanto™II	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
FACSCalibur	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Gefriermikrotom Frigocut 2800	Reichert-Jung, Wien
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr, Biberach an der Riss
Gefrierschrank, -80°C	Thermo Scientific, Waltham (USA)
IN Cell Analyzer 1000	GE Healthcare, Waukesha (USA)
Kühlschrank, 4°C	Liebherr, Biberach an der Riss
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	IKA, Staufen
Microplate Washer ELx405 Select CW	BioTek, Winooski (USA)
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 100 (LSM510)	Zeiss, Oberkochen
Mikrowellengerät	MDA
NanoDrop® ND-1000	Thermo Scientific, Dreieich
Pearl Imager	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetboy acu	Integra, Fernwald
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Power Supply: PowerPac Basic / PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Sterilwerkbank LaminAir	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Thermocycler	Biometra, Göttingen

Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 3722L	Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ultra-Turrax T8	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage	Kern
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

96-well-Platten, runder Boden	Greiner bio-one, Kremsmünster (A)
96-well BIND® Biosensor Platten	SRU Biosystems, Woburn (USA)
Durchflusszytometer-Röhrchen	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Pechiney, Chicago (USA)
Papierfaltenfilter	Machery-Nagel,
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Einmal-Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
ProxiPlate-384 Plus, weiß	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Reagenz Reservoir	Corning, Amsterdam (NL)
Reaktionsgefäße 1,5 ml / 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubröhrchen 2 ml, Cryo	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubröhrchen 15 ml	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Schraubröhrchen 50 ml	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Zellkulturplatten standard (6-, 12-, 24-, 96 well)	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Zellkulturplatten Microtest Optilux 96 well	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Zellkulturplatten 96 Well, weiß	Corning, Amsterdam (NL)
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)

2.1.3 Chemikalien

Agarose GTQ	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Ampicillin (Natriumsalz)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Citronensäure-1-Hydrat	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe

DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
6 x DNA Loading Dye	Fermentas, St.Leon-Rot
dNTP-Mix	Peqlab, Erlangen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Ethanol absolut	J.T.Baker, Deventer (NL)
Ethanol 100 % (MEK)	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Fluo-4AM	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Formaldehyd 4%	Herbeta Arzneimittel, Berlin
D-(+)-Glucose, wasserfrei	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Immu Mount	Thermo scientific
Indodicarbocyanine (IDCC)	Mivenion GmbH, Berlin
Isopropanol	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
jetPEI, Transfektionsreagenz	Polyplus Transfection, Illkirch Cedex (F)
Kaliumalaunsulfat (KAl(SO ₄) ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
LB-Agar	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Natriumjodat (NAJO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Probenicid	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Propidiumiodid	Applichem, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Tween 20	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe

2.1.4 Antikörper

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Antikörper und deren Verdünnung.

Primäre Ak.	Eingesetzte Verdünnung (Konz.)		Hersteller
	IHC	IF	
Ziege α OXR1 (C-19) SC-8072 (0,2mg/ml), Polyklonal	1:250 (0,8 μ g/ml)	1:100 (2 μ g/ml)	Santa Cruz Biotechnology, inc., CA (USA)
Kaninchen α OXR1 (#AOR-001) (0,8mg/ml), Polyklonal	1:300	-	Alomone
α Mensch CK19 (40mg/L), Monoklonal	1:400	-	DAKO, Hamburg
Maus α Mensch Vimentin (Clone V9) V6630 (9,8mg/ml)	1:400	-	Sigma, St.Louis (USA)
α HA (H3663) (1mg/ml), Monoklonal	-	1:1000	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Sekundäre Ak.	eingesetzte Verdünnung (Konz.)		Hersteller
	IHC	IF	
Biotinylierter Kaninchen α Ziege IgG (E 0466) (0,8mg/ml)	1:200	-	DAKO, Hamburg
Biotinylierter Kaninchen α Maus IgG	1:400	-	DAKO, Hamburg
Cy3konjugierter Esel α Ziege IgG (1,5mg/ml)	-	1:400	Dianova, GmbH, Hamburg
Cy2konjugierter Esel α Maus IgG (1,4mg/ml)	-	1:500	Dianova, GmbH, Hamburg

2.1.5 Peptide

Humanes zyklisches Orexin A, Orexin B	Bachem, Bubendorf (CH)
Humanes zyklisches und lineares Orexin A	peptides&elephants, Potsdam
Humanes zyklisches Orexin A – IDCC	peptides&elephants, Potsdam
Tumornekrosefaktor α (TNF α)	PeptoTech, USA
Cycloheximid (CHx)	Sigma, Deisendorf
Immunogenes Peptid (C-19)	Santa Cruz Biotechnology, inc., CA (USA)
Humanes “scrambled” Chemerin-9-IDCC	peptides&elephants, Potsdam

2.1.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase, (CIP) (10 U/ μ l)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
PWO DNA-Polymerase (1 U/ μ l)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
RNaseA	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen Typ II:	
EcoRI, XhoI, BamHI, PmeI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
T4 DNA-Ligase (4 U/ μ l)	New England Biolabs, Ipswich (USA)

2.1.7 Kits

RNA 6000 Nano Chip Kit	Agilent, Waldbronn
RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR System	Invitrogen, Carlsbad (USA)
RiboPure™	Ambion, Carlsbad (USA)
SuperScript II Reverse Transcriptase Enzyme Kit	Invitrogen, Carlsbad (USA)
LANCE™ cAMP 384 Kit	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Liquid DAB+ Substrat Chromogen System	Dako, Hamburg
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.1.8 Standards

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot

2.1.9 Primer und Plasmide

a) Primer

Name Primer	Template	Sequenz [bp]	Schnittstellen und Epitope
BB5 vorwärts Primer	OXR1 (1278bp)	5' [gat gaa ttc taa acc atg tac cca tac gat gtt cca gat tac gct gagccctcagccaccccagg]3'	EcoRI (rot), HA-Epitop (grün)
BB6 rückwärts Primer	OXR1 (1278bp)	5'[tcg ctc gag tca ggg cag cac tgt ggt gac gct gg]3'	xhoI (rot)

Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

b) Kommerziell erworbene Plasmide

Plasmid	Größe [bp]	Resistenz	Hersteller
pcDNA 3.1(+)	5427	Ampicillin	Invitrogen, Carlsbad (USA)
pIRES	5749	Ampicillin	Clontech Labora., Inc., Mountain View (USA)
pcDNA3.1OXR1 (#HCR0100000)	6705	Ampicillin	Missouri S&T cDNA Resource Center, (USA)

c) Selbst generierte Plasmidkonstrukte

Konstrukt	Resistenz	Primer	Restriktion
pcDNA3.1 HA-OXR1	Ampicillin	BB5, BB6	EcoRI, xhoI
pIRES HA-OXR1	Ampicillin	-	BamHI, PmeI

2.1.10 Zellen

a) Prokaryotische Zellen

E. coli Top10, chemisch kompetent

Invitrogen, Carlsbad (USA)

b) Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Spezies	Herkunft	Kulturmedium
Kyse140	Human	Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	RPMI Kompletmedium
Kyse180	Human	Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	RPMI Kompletmedium
Kyse410	Human	Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	RPMI Kompletmedium
Kyse520	Human	Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	RPMI Kompletmedium
OE19	Human	Ösophagus, Adenokarzinom	RPMI Kompletmedium
OE21	Human	Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	RPMI Kompletmedium
OE33	Human	Ösophagus, Adenokarzinom	RPMI Kompletmedium
HT-29	Human	Ösophagus, Kolorektalkarzinom	RPMI Kompletmedium
MiaPaca2	Human	Pankreas, Adenokarzinom	DMEM Kompletmedium
Hek293a	Human	Embryonale Nierezellen	RPMI Kompletmedium

c) Genetisch veränderte Zelllinien

Name	Hintergrund	Plasmid	eukaryotische Resistenz
A4	Hek293a	pcDNA3.1 HA-OXR1	G418
OXR1-Klon	Hek293a	pIRES HA-OXR1	Hygromycin B

2.1.11 Materialien für die Zellkultur

a) Zellkulturmedien für Eukaryotische Zellen

Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Genitacin 418 (G418)	Biochrom AG, Berlin
Glutamax	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Hank's Salt Solution (HBSS)	Biochrom AG, Berlin
Hygromycin	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Dulbecco's Modifizierte Medien (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
3,7 g/L NaHCO ₃ , 4,5 g/L D-Glucose, Na-Pyruvate	
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
(<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)	
2,0 g/L NaHCO ₃ , stabiles Glutamin	
Tryptin/EDTA	Biochrom AG, Berlin

Zusammensetzung der verwendeten Medien:

RPMI Komplettmedium	RPMI 1640 Medium + 10 % FCS
DMEM Komplettmedium	DMEM + 10 % FCS + 1 % Glutamax
Einfriermedium	90 % FCS + 10 % DMSO

b) Zellkulturmedium für Bakterienzellen

LB Medium: 1 % Bactotrypton, 0,5 % Hefe Extrakt,
1 % NaCl; pH 7,0

LB Agarplatten: 1 % Bactotrypton, 0,5 % Hefe Extrakt,
1 % NaCl, 1,5 % Bactoagar; pH 7,0

autoklavieren, mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzen, Platten sofort gießen

2.1.12 Puffer und Lösungen

Blockierungspuffer für Immunfluoreszenzen 5 % BSA in PBS

C1-Waschpuffer 130 mM NaCl, 5 mM KCl,
10 mM Na-HEPES,
2 mM CaCl₂, 10 mM Glucose

Hämalaun nach Mayer 1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat,
50 g Kaliumalaunsulfat, 50 g Chloralhydrat,
1 g Citronensäure-1-Hydrat → ad 1 l dH₂O

PBS 1x 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄,
2.7 mM KCl, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4

Ligandenpuffer Durchflusszytometrie 50 mM Tris-Cl [pH 7,4], 5 mM MgCl₂, 1 mM
CaCl₂, 100 mM NaCl, 4 % BSA

Färbelösung Zell-Zyklus Analyse 25 ml 1xPBS
500 µl PI (1mg/ml) → 20 µg/ml
50 µl RNase A (100 mg/ml) → 200 µg/ml

Fixierlösung für Immunfluoreszenzen und
Durchflusszytometer Analysen
mit IDCC Peptiden 4 % PFA/PBS pH7,0

TAE Puffer 40 mM Tris, 5 mM Essigsäure, 1 mM EDTA

Probenpuffer 6x 0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin

2.1.13 Software

ABI SDS 2.2 Realtime-PCR Software	Applied Biosys., Carlsbad, USA
Axiovision release v4.7	Zeiss, Oberkochen
GraphPad Prism 4, 5	GraphPad Software Inc., La Jolla (USA)
IN Cell Developer Toolbox 1.8	GE Healthcare, Waukesha (USA)
IN Cell Investigator 3.6	GE Healthcare, Waukesha (USA)
Vector NTI Advance 10, 11	Invitrogen, Carlsbad (USA)
CellQuest Pro v5.2	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
FACSDiva v6.0	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
EMS 2.1	SRU Biosystems, Woburn (USA)
Pearl Imaging Software	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Eine PCR basiert auf sich wiederholenden Zyklen. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang denaturiert. Dann können kurze synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) komplementär an die DNA-Matrize binden („*annealing*“). Die Polymerase amplifiziert nun die zwischen den Oligonukleotiden liegende DNA-Sequenz („*primer extension*“). Mit der Verwendung modifizierter Primer können damit kurze Sequenz-Motive in ein PCR-Produkt eingebracht werden.

In dieser Arbeit wurde eine Sequenz an den N-Terminus des OXR1 angefügt. Diese kodiert für eine kurze Aminosäuresequenz, genannt HA-Epitop, die mittels eines α HA-Antikörpers detektiert werden kann. Die verwendeten modifizierten Primer sind in (2.1.9 a) aufgelistet, die Reaktion erfolgte nach folgendem Ansatz:

Programm:

94°C	2 min	
94°C	30 sec	} 30x
60°C	45 sec	
68°C	1 min	
68°C	5 min	
4°C	∞	

Mix1

1 μ l DNA-Matrize (100-200 ng Plasmid DNA)
2 μ l dNTP (10 mM dNTP)
2 μ l Vorwärts-Primer (20 pmol)
2 μ l Rückwärts-Primer (20 pmol)
18 μ l H ₂ O

Mix2

5 μ l 10x Reaktionspuffer für Pwo-Polymerase
3 μ l Pwo-Polymerase (1u/ μ l)
17 μ l H ₂ O

2.2.1.2 Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte nach ihrer Größe erfolgt mittels der Agarosegelelektrophorese. Hierzu wurden 1 %ige Agarosegele in TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Das Ethidiumbromid lagert sich in die DNA-Fragmente ein und macht sie unter UV-Licht sichtbar. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6x DNA Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer bei 100 V für ca. 30 min. Um die Größen der DNA-Fragmente identifizieren zu können wurde ein DNA-Größenstandard mitgeführt.

Anschließend wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte gemäß der Herstelleranleitung mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Die anschließende Elution erfolgt mit 30 µl bidestilliertem Wasser (ddH₂O).

2.2.1.3 Restriktion

Um das aufgereinigte PCR-Produkt (2.2.1.2) gerichtet in ein Plasmid ligieren zu können, werden das PCR-Produkt (Insert) und das Plasmid mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Diese spalten doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungssequenzen hydrolytisch. So entstehen spezifische überstehende Enden, die ligiert werden können. In solch einem präparativen Verdau werden etwa 5 µg DNA mit einem fünffachen Überschuss an Enzymaktivität unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen für eine Stunde verdaut.

Weiter wurde die Restriktion isolierter Plasmid-DNA (2.2.1.7) genutzt, um plasmidtragende positive Bakterienklone zu ermitteln. Hierfür wurden ca. 0,2-0,5 µg aufgereinigte Plasmid-DNA eingesetzt. Nach der Restriktion des PCR-Produkts bzw. der Linearisierung des Plasmids werden die Enzyme 20 min bei 65°C inaktiviert.

Um die Inserts von dem Restriktionsansatz zu trennen, wurde wieder eine Aufreinigung mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die anschließende Elution erfolgt mit 30 µl ddH₂O.

2.2.1.4 Dephosphorylierung

Linearisierte Plasmide wurden dephosphoryliert, um eine Schließung des DNA-Rings wieder zu verhindern und so die Erfolgchancen der Ligation zu erhöhen. Dazu wurde die alkalische Phosphatase nach Herstellerangaben benutzt. Das Plasmid wurde über ein Agarosegel und anschließender Isolierung mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt

2.2.1.5 DNA-Ligation

Bei der Ligation katalysiert die Ligase die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5' Phosphat und einem 3' hydroxyl Ende. Somit können mit der Ligase DNA-Fragmente verknüpft

werden. Dazu werden etwa 200 ng des PCR-Produktes zusammen mit 50 ng des linearisierten Plasmids nach Herstellerangaben in einem 20 µl Ansatz für 1 h bei RT inkubiert. Es wird immer eine Ligationskontrolle mitgeführt ohne Insert. Die so entstandenen rekombinanten Plasmide können in kompetente Bakterien eingeschleust werden (Transformation).

2.2.1.6 Transformation

Für die Transformation der Ligationsreaktion in Bakterien wurden chemisch kompetente *E. coli* TOP10 (Invitrogen) Zellen nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dazu wurden die *E. coli*-Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und 1 µl des Ligationsansatzes (2.2.1.5) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C, was die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterienzellen bewirkt. Anschließend werden 200 µl LB Medium zugegeben und nach einer einstündigen Inkubation im Schüttler bei 37 °C auf eine LB-Agar-Platte mit Ampicillin ausgestrichen.

Nach 24 h wurde mit den gewachsenen Kolonien jeweils eine 4 ml LB Medium Bakterienkultur mit Ampicillin angeimpft, welche über Nacht bei 37 °C geschüttelt wurde und am nächsten Tag die DNA isoliert wurde (2.2.1.7).

2.2.1.7 Isolation von DNA

Um plasmidtragende Bakterienklone zu identifizieren, wurde mit den Übernachtskulturen (2.2.1.6) eine Plasmid-DNA-Isolation mittels des QIAprep® Spin-Miniprep-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgt mit 30 µl ddH₂O. Anhand eines analytischen Restriktionsverdau (2.2.1.3) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.2) wurde die Transformation und die Insertion des PCR-Produkts in das Plasmid überprüft.

Eine präparative Isolation von Plasmid-DNA in großem Maßstab erfolgte aus 500 ml LB Medium Bakterienkulturen mit dem NucleoBond® Xtra-Maxi-Plus-Kit nach Herstellerangabe. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 500 µl H₂O eluiert. Die Plasmid-DNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt (2.2.1.9) und die korrekte DNA-Sequenz durch DNA-Sequenzierung (2.2.1.8) kontrolliert.

2.2.1.8 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics (Berlin) mit Plasmid-spezifischen Primern durchgeführt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Vector NTI Advance 11.

2.2.1.9 DNA- und RNA-Quantifizierung

Die Konzentration wässriger DNA- und RNA-Lösungen wurde photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm (A₂₆₀) bestimmt, wobei der Absorptionskoeffizient (A_{k_o}) für doppelsträngige DNA 50 µg/ml und für RNA 40 µg/ml beträgt.

Konzentration c (µg/µl) = A₂₆₀ x A_{k_o} µg x VF (VF= Verdünnungsfaktor)/1000 µl.

Die Reinheit wurde mittels des A₂₆₀/A₂₈₀ Quotient bestimmt. Dieser sollte bei 1,6 bis 1,8 liegen und gibt die Proteinverunreinigung der DNA an. Es wurden ausschließlich RNA-Isolationen mit einem Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ von 1,8 bis 2,1 verwendet. Die Konzentration der isolierten DNA wurde mit dem Photometer der Firma Eppendorf, die der RNA mit dem NanoDrop® ND-1000-Spektrophotometer bestimmt.

2.2.1.10 RNA-Präparation aus humanen Tumorzelllinien

Die Isolierung der RNA aus den humanen Tumorzelllinien erfolgte mit Hilfe des RiboPure™ RNA-Isolations-Kit der Firma Ambion®. Bei dieser Methode handelt es sich um eine spezifische Aufreinigung der Gesamt-RNA über hydrophile Siliziumgel-Säulen unter Verwendung geeigneter Puffersysteme. Zuerst wurden die Zellen in TRI Reagent® homogenisiert und lysiert. Dies erfolgte unter Zuhilfenahme des Ultra-Turrax T8. Die Phenol und Guanidin-Thiocyanat enthaltende Lösung lysiert die Zellen und inaktiviert Nukleasen. Nach Chloroformzugabe wird mittels Zentrifugation das Gemisch in organische und wässrige Phase separiert. Die wässrige Phase enthält die RNA, welche nach Dekantieren mit Ethanol versetzt und durch anschließende Zentrifugation auf die Säule gebunden wird. Nach mehreren Waschschrinen wurde die reine Gesamt-RNA in Nuklease-freiem Wasser eluiert.

2.2.1.11 RNA-Qualitätskontrolle

Die Qualität der RNA ist ein Maß für ihre Degradation. Nur RNA mit sehr guter Qualität, also wenig Degradation, sollte möglichst für nachfolgende Analysen benutzt werden. Diese Integrität der extrahierten RNA wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, USA) überprüft. Dazu wurde das RNA-Nano-Kit 6000 (Agilent, Palo Alto, USA), eine Chip-Technologie, eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgt aufgrund der Degradierung der rRNA. Das Prinzip basiert auf einer Markierung der RNA mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen. Diese farbstoffmarkierte RNA wird im Chip nach dem Prinzip der Mikrofluidik (Steuerung winziger Flüssigkeitsmengen in einem miniaturisierten System) kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und über einen Laser detektiert. Mit Hilfe der dazugehörigen Software, wurden die Messungen automatisch analysiert. Dabei wurde mit einem speziellen Algorithmus eine sogenannte RNA *integrity number* (RIN) berechnet, wobei die Werte auf einer Skala von 1 (vollständige Degradation) bis 10 (hohe Qualität, keine Degradation) liegen. Für die quantitativen Echtzeit-PCR wurden ausschließlich Proben verwendet, die einen RIN von 7 oder höher aufwiesen.

2.2.1.12 Quantitative Echtzeit-PCR – TaqMan

Die quantitative Echtzeit-PCR unterliegt dem Prinzip der herkömmlichen PCR (2.2.1.1.), es ist jedoch zusätzlich die Quantifizierung der vervielfältigten Nukleinsäuren möglich, die Rückschlüsse auf die anfängliche Kopienzahl eines spezifischen Transkripts zulässt. Die Quantifizierung beruht auf der Messung eines Fluoreszenzsignals während eines PCR-Zyklus (Echtzeit), welches proportional mit der Menge an PCR-Produkte zunimmt. Anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale wird die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen.

Für die quantitative Echtzeit-PCR wird der TaqMan® Gene Expression Assays (Hs00173513_m1, Hs00155416_m1) der Firma ABI (Applied Biosystems) und das ABI Prism™ 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) verwendet.

Die kommerziell erhältlichen Assays enthalten jeweils zwei getestete Primer für das entsprechende Gen, sowie eine sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonde (TaqMan Probe). An die Fluoreszenzsonde ist am 5'-Ende ein Reporter-Farbstoff (FAM) und am 3'-Ende ein Quencher-Farbstoff (TAMRA) gekoppelt. Nach dem FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) basiertem Prinzip, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch die räumliche Nähe des Quencher unterdrückt. Zunächst hybridisiert die TaqMan-Probe und die spezifischen Primer an den Matrizen-Strang. Bei der Amplifizierung verdrängt die Polymerase, die den Matrizen-Strang vom 3'-Ende zum 5'-Ende abliest, die Sonde und hydrolysiert diese. Dabei wird der Reporter-Farbstoff vom Quencher-Farbstoff räumlich getrennt, so dass der Reporter-Farbstoff nun ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals lässt sich in einer logarithmischen Funktion (Menge Amplifikat gegen Zyklenzahl) darstellen. Ein quantifizierbarer Anstieg ist nur in der exponentiellen Phase gewährleistet. Der Ct-Wert (Cycle Threshold) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Somit dient der Ct-Wert als Maß zur Quantifizierung der Ausgangsmenge. Es wurde der Kit „RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR System“ (Invitrogen) verwendet, bei welchem direkt mit der Gesamt-RNA gearbeitet wurde. Das Kit erlaubt die reverse Transkription und die PCR in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Es wurde ein Endvolumen von jeweils 10 µl in einer 384-Well Platte für die PCR eingesetzt. Der Ansatz enthielt 0,5 µl RNA, 2 µl Master Mix (5x), 0,5 µl TaqMan® Gene Expression Assay GAPDH (20x), 0,5 µl TaqMan® Gene Expression Assay HCRTR 1 bzw. 2 (20x), 0,5 µl RNA Ultrasense Enzyme Mix, ROX Reference dye sowie 5,8 µl DEPC behandeltes Wasser.

Zuerst erfolgte die reverse Transkription für 15 min bei 50°C. Daran schloss sich der PCR-Aktivierungsschritt (2 min bei 95°C) an. Dabei wurde die Polymerase aktiviert, die reverse Transkriptase inaktiviert und das cDNA-Template denaturiert. Anschließend folgte für 50 Zyklen ein Wechsel von 15 s 95°C und 30 s 60°C.

Für alle quantitativen Echtzeit-PCR-Versuche wurde GAPDH als „housekeeping“-Gen verwendet. Außerdem wurden alle Proben als Triplikate untersucht.

Berechnung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Zunächst wurde die Expression der untersuchten Gene auf die Expression des *Housekeeping*-Gens GAPDH normalisiert. Dazu wurde der ΔCt -Wert berechnet, welcher sich aus der Differenz zwischen dem Ct des untersuchten Gens und dem Ct des „*housekeeping*“-Gens ergibt. Über die Differenz zwischen den ΔCt -Werten und einer internen vergleichenden Probe wurde der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert berechnet. Die relative Expression (R) wurde mit der Formel $R = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ bestimmt (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C mit 5-prozentiger CO₂-Atmosphäre in RPMI 1640 Komplettmedium (Hek293a-Zellen, HT-29 und alle Ösophaguszelllinien) und DMEM-Komplettmedium (MiaPaca2) mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum in 75 cm³ Zellkulturflaschen kultiviert. Die Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter der Sterilwerkbank LaminAir ausgeführt. Bei 90- bis 100-prozentiger Konfluenz der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und nach kurzer Inkubation mit Trypsin EDTA mit Kulturmedium vom Boden abgelöst. Ein Zehntel der Zellen wurden wieder ausgesät und mit ausreichend Medium bedeckt. Zur weiteren Verwendung wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Zellen in einem der großen Quadrate, die einem Volumen von 0,1 mm³ entsprachen, berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml Medium}$$

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden zwei Quadrate ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Die Zellzahlen wurden entsprechend eingestellt und die Zellen so für weitere Versuche ausgelegt.

2.2.2.2 Transfektion

Das Einbringen eines Plasmids in Hek293a-Zellen erfolgte mit dem Transfektions-Reagenz jetPeiTM. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Hierzu wurden die zu transfizierenden Zellen zunächst kultiviert bis sie eine Konfluenz von ca. 70 % aufwiesen. Die entsprechend nach Protokoll angegebene Plasmid-Konzentration und jetPeiTM-Konzentration wurden jeweils in 150 mM NaCl₂ verdünnt. Dann wurde die jetPeiTM-Lösung zu der Plasmid-Lösung gegeben und nach dem Vortexen nochmals mindestens 20 min inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde in das Komplettmedium der Zellen gegeben und nach 24 h mit frischem Medium ersetzt. Nach 24 h oder 48 h Transfektion werden die Zellen weiter verarbeitet.

2.2.2.3 Generierung stabiler Zelllinien

Um eine Zelllinie herzustellen, die stabil mit einem Plasmid transfiziert ist, wird zunächst eine wie in 2.2.2.2 beschriebene Transfektion durchgeführt. Eine eukaryotische Antibiotikaresistenz ist notwendig als Selektionsmarker. 24 h nach der Transfektion werden die Zellen im Selektionsmedium gehalten, um das Absterben der nicht transfizierten Zellen und die Integration der Plasmid-DNA in die genomische DNA zu gewährleisten. Nach ein paar Tagen wurden ca. 200 selektierte Zellen auf eine 10-cm-Zellkulturschale ausgelegt und diese unter Selektionsdruck mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Nach ca. einer Woche konnten mit dem CellCelector (Aviso) einzelne Klone gepickt und in die Wells einer 96-well-Zellkulturplatte überführt werden. Diese wurden dann weiter kultiviert und auf Integration des Plasmids überprüft. Hierzu wurde die Expression des eingebrachten OXR1 mittels Immunfluoreszenz (IF) und Kalzium-Mobilisierung getestet. Für die Selektion und auch die weitere Kultivierung der stabilen Zellen wurden die Antibiotika G418 (0,6 mg/ml) und Hygromycin B (0,1 mg/ml) mit den angegebenen Konzentrationen verwendet.

2.2.3 Funktionelle Methoden

2.2.3.1 Proliferationsassay

Die Ermittlung der Wachstumsrate einer Zelllinie nach Applikation verschiedener Substanzen beruht auf der Detektion und Zählung der Zellkerne mittels einer DAPI-Färbung. DAPI ist ein blau-violett emittierender Fluoreszenzfarbstoff, der die Zellkerne anfärbt, da er in der DNA interkaliert. Hierzu wurden 1×10^4 Zellen pro Well in optische 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h und 96 h Inkubation mit den entsprechend angegebenen konzentrierten Peptiden wurden die Zellen mit 4 % PFA für 10 min fixiert (100 μ l pro Well). Dann erfolgte die DAPI-Färbung für 10 min mit 100 μ l DAPI-Lösung pro Well (0,25 μ g/ml DAPI in 0,1 % Triton/PBS). Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS wurden 100 μ l pro Well in der Platte belassen und bei 4°C im Dunkeln bis zur Messung aufbewahrt. Die Bilder wurden mit dem IN-Cell-Analyzer 1000, einem automatisierten Hochdurchsatz Fluoreszenzmikroskop (GE Healthcare), aufgenommen. Es wurden vier Bilder pro Well mit einem 4x-Objektiv aufgenommen. Die verwendete Belichtungszeit beträgt 50 ms für DAPI. Die Bilder wurden anschließend mit der IN-Cell Investigator-Software analysiert. Dabei wurden alle detektierten Bereiche über 50 μm^2 als Zellkerne (Nuclei) identifiziert und gezählt.

Die Positivkontrolle stellte hier Kompletmedium dar, die negativen Kontrollen wurden nur mit RPMI 0,5 % FCS (Minimalmedium) inkubiert. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in Minimalmedium (0,5 % FCS) gelöst und auf die Zellen gegeben. Das Medium inklusive der Substanzen wurden alle 24 h erneuert. Die Zellzahlen nach 96 h wurden durch die Zellzahlen nach 24 h geteilt und so die Wachstumsrate errechnet. Es wurden jeweils sechs Replikate pro Versuch für jede Substanz angesetzt, d.h. sechs Wells pro Substanz, Zelllinie und Zeitpunkt. Gezeigt sind die

Mittelwerte der Wachstumsraten und deren Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Der Proliferationstest mit den HT-29-Zellen war etwas anders aufgebaut. Als Kontrollen wurden eine Apoptosekontrolle und eine Positivkontrolle (Komplettmedium) mitgeführt. Die Induktion von Apoptose erfolgte mittels des Tumornekrosefaktors α (TNF α) und Cycloheximid (CHx). Die Bindung extrazellulärer Liganden der TNF-Superfamilie (TNF α , TNF-related apoptosis-inducing ligand (Trail) und Fas Ligand (FasL) (Leong & Karsan, 2000) an entsprechende Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie (TNF-R, TRAIL-R, Fas/CD95) führt zur Trimerisierung der Rezeptoren und damit zur Apoptose der Zelle (Krammer, 2000). Um die zelleigenen Reparaturmechanismen zu unterbinden und so schnell und effizient Apoptose auslösen zu können, wurde zusätzlich CHx verwendet, welches die Proteinbiosynthese blockiert, indem die Translation inhibiert wird.

Die HT-29-Zellen wurden über 48 h mit OXA (1 μ M), OXB (1 μ M) und TNF α (50 ng/ml) + CHx (10 μ g/ml) in Komplettmedium inkubiert. Die Zellzahlen nach 48 h wurden auf die Positivkontrolle (Komplettmedium) bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Auswertungen und Darstellungen erfolgten mit GraphPad Prism, eventuelle signifikante Unterschiede wurden mit einem ANOVA Test mit einem Signifikanzlevel α 0,05 (95 % Konfidenz Interval, P < 0,05 *, P < 0,01 **, P < 0,001 ***) ermittelt.

2.2.3.2 Zellzyklus-Analyse

Hier wird die DNA eukaryotischer Zellen durch Einlagerung von Propidiumiodid (PI) markiert, um Zellzyklusanalysen erstellen und die Apoptoserate einer Zellpopulation bestimmen zu können. Der DNA-Gehalt einer Zelle ist abhängig von ihrer Zellzyklusphase. Im G1/G0-Stadium liegt ein einfacher Chromosomensatz vor, der sich in der S-Phase verdoppelt. In der G2-Phase liegt dann der doppelte Chromosomensatz vor. Der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen liegt noch unter dem ruhender Zellen (G0-Phase) bzw. von Zellen in der G1-Phase. Propidiumiodid (PI) interkaliert in der DNA, je nach DNA-Gehalt und somit PI-Einlagerung verändert sich die Fluoreszenzintensität zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen. Mittels des Durchflusszytometers kann die Fluoreszenzintensität des PI detektiert und so jeder Zellzyklusphase zugeordnet werden.

Zellen wurden über 48 h mit Komplettmedium mit und ohne OXA, OXB und TNF α + CHx behandelt. Ca. 2×10^5 Zellen werden trypsinisiert und in ein 15-ml-Röhrchen überführt und 6 min bei 400 g (1500 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen, das Pellet in 900 μ l PBS resuspendiert und zur Vereinzelung der Zellen zehnmal durch eine Multipette mit 10- μ l-Spitze gezogen. Beim Vortexen der Zellen werden tropfenweise dreimal 700 μ l 100 % Ethanol zugegeben (final 70 % Ethanol), bevor die Proben mindestens über Nacht bei -20 °C gelagert werden. Die Zellen werden zentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen und in 200 bis 500 μ l Färbelösung resuspendiert. Die Färbelösung enthält neben dem PI auch RNase A, um eine Verfälschung der Färbung aufgrund von PI-Einlagerung in der RNA

zu verhindern. Nach 20 min Inkubation bei 37 °C im Dunkeln werden mindestens 10000 Zellen mit Hilfe der CellQuest-Pro-Software im FACSCalibur-Gerät (BD Biosciences) analysiert. Das FACSCalibur-Gerät enthält einen Argonlaser (488 nm) und einen Diodenlaser. Über die Anregung mit dem Argonlaser wurden das Streulicht und die Fluoreszenz der Wellenlänge 585 nm (FL2) und 650 nm (FL3) gemessen. Die Parameter der Zellen wurden mit dem Programm CellQuest pro analysiert. Zur Verdeutlichung der Durchflusszytometer-Messungen und deren Auswertung wird eine Beispielmessung gezeigt. Zur Auswertung wurde zunächst auf die zu analysierende Population im FSC und SSC ein *Gate* (G1) gesetzt, um Zelltrümmer auszugrenzen (Abb. 8 A). Dieses *Gate* wird auf das in Abb. 8 B) gezeigte Histogramm angewendet.

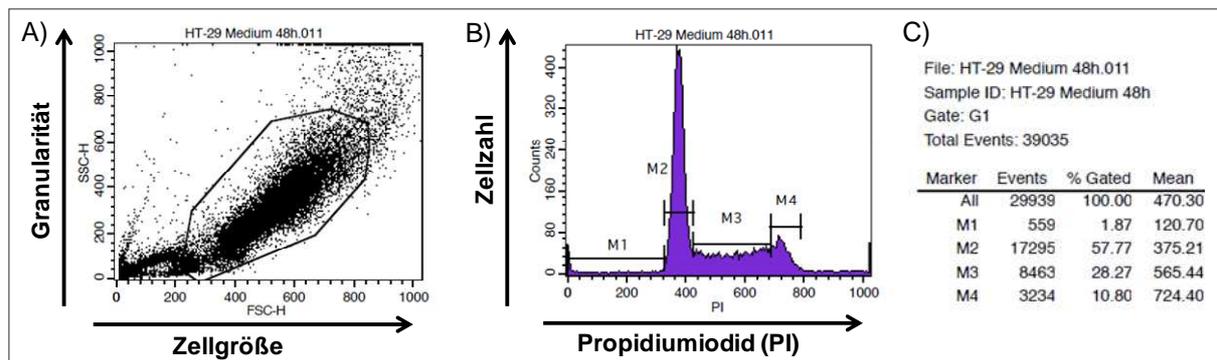


Abb. 8: Beispielmessung und Auswertung einer durchflusszytometrischen Analyse von HT-29 Zellen mittels PI-Färbung. A-C) unbehandelte HT-29 Zellen. A) dot Plot von allen gemessenen Zellen. Zu sehen ist die Größe (FSC) gegen die Granularität (SSC) der Zellen. B) Histogramm der Zellen in Gate 1 (G1). Histogramme zeigen die Zellzahlen gegen die PI Fluoreszenz. C) Statistische Auswertung.

Ein Histogramm zeigt die Zellzahlen gegen die Fluoreszenzintensität des Propidiumiodids (PI) jeder einzelnen Probe. In diesem Histogramm sind zwei Peaks zu beobachten: der erste Peak in Abb. 8 B bezeichnet mit M2, stellt die Zellen in der G1-Phase dar (einfacher Chromosomensatz), der kleinere zweite Peak (M4) bildet die Zellen ab, die sich in der G2-Phase (doppelter Chromosomensatz) des Zellzyklus befinden. Zwischen diesen beiden Peaks sind die Zellen zu finden, die sich in der S-Phase aufhalten (M3). Die apoptotischen Zellen hingegen, die durch die DNA-Fragmentierung weniger DNA enthalten, liegen vor dem G1-Peak, Sub-G1 (M1). Die statistischen Daten aus den Histogrammen (Abb. 8 C) wurden für die weitere Auswertung in Balkendiagrammen verwendet. Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen sind gezeigt als Mittelwerte \pm SD. Um Signifikanzen aufzeigen zu können, wurde mit der GraphPad-Prism-Software ein ANOVA Test mit einem Signifikanzlevel von $\alpha=0,05$ % ($P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***) durchgeführt und dargestellt.

2.2.3.3 Kalziummobilisierung (Ca^{2+} -Mobilisierung)

GPCRs, die über das $\text{G}\alpha_q$ -Protein direkt an den IP_3 -Signaltransduktionsweg gekoppelt sind, führen zu einer Ca^{2+} -Mobilisierung aus den intrazellulären Speichern der Zellen, was einen Anstieg der zyttoplasmatisch freien Kalziumionen verursacht. Diese Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann indirekt über kalziumsensitive Farbstoffe detektiert werden. Hierbei werden die Zellen mit dem zellpermeablen Kalzium bindenden fluoreszierenden Farbstoff Fluo-4AM beladen. Zunächst liegen die kalziumsensitiven Carboxylatgruppen dieses Indikators als Acetoxymethylesterform (AM-Form) vor, was der Substanz aufgrund des ungeladenen, hydrophoben Zustands ermöglicht, die Zellmembran zu passieren. Die metabolische Aktivierung durch intrazelluläre Esterasen führt zur Freilegung der Indikatorregionen und somit zur Kalzium bindenden Form des Fluo-4. Das gebundene Kalzium kann fluoreszenzspektroskopisch dargestellt werden. Die Anregungswellenlänge beträgt 485 nm. Gemessen wird bei einer Emissionswellenlänge von 535 nm. Diesem Prinzip unterliegt die hier angewendete Methode des „Kalzium-Imaging“. Diese Veränderungen der Fluoreszenz wurden mit einem Cellux der Firma Perkin Elmer gemessen. Am Vortag des Experiments werden die Zellen auf schwarzen 96-Well-Platten mit klarem Boden (BD Falcon, Microtest, Optilux) ausgelegt. Nach 24 h Kultivierung der Zellen werden sie für mindestens 2 h mit serumfreien Medium inkubiert. Es wird zunächst ein C1-Waschpuffer hergestellt, ein geringes Volumen dieses C1-Waschpuffers wird mit 0,1 % BSA versetzt und als Ligandenlösung benutzt. Die Liganden werden in diesem Ligandenpuffer verdünnt, wobei jeweils die doppelte Konzentration der angegebene angesetzt wird, um den Verdünnungseffekt bei der Ligandenapplikation im Gerät (100 μl Ligandenlösung in 100 μl C1-Waschpuffer) auszugleichen. Je 120 μl dieser Ligandenlösungen werden pro Well in eine unsterile U-förmige 96-Well-Platte pipettiert. Das serumfreie Medium wird von den Zellen abgenommen und mit 50 μl Beladungslösung (2 μM Fluo-4AM, 2,5 μM Probenecid in serumfreiem Medium) ersetzt. Der parallele Einsatz des Anionentransportblockers Probenecid verhindert ein Ausströmen der aktivierten Fluo-4-Moleküle aus der Zelle. Die Beladungslösung mit dem kalziumsensitiven Farbstoff wurde für 45 min bei 37 °C auf den Zellen inkubiert und hinterher durch Waschen mittels eines Plattenwaschgeräts (Biotech ELx405CW) mit C1-Waschpuffer entfernt. Der Waschvorgang ist so eingestellt, dass 100 μl C1 Waschpuffer pro Well der Messplatte verbleiben. Dieser Waschschrift wird nach 20 bis 30 min wiederholt, um von den Zellen ausgeschiedene Farbstoffreste zu entfernen. Nach 30 min Inkubation der Zellen im C1-Waschpuffer wird die Platte direkt im Cellux analysiert. Die Zugabe der Liganden erfolgte automatisiert im Cellux 30 s nach Messbeginn. Für die Messung wurde das Anregungsfilter 485 nm und das Emissionsfilter 535 nm benutzt.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Versuche untereinander wurden die jeweiligen Basisfluoreszenzwerten von den maximalen Fluoreszenzwerten nach Liganden-Applikation subtrahiert (*Resp. Max - Resp. Min*) und auf die Basisfluoreszenz (*Base Mean*) normiert.

Die Konzentrations-Wirkungskurve wurde mit GraphPad Prism 5.0 erstellt. Dabei gilt die nichtlineare Regression nach der Formel $y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{\log EC_{50} - X})$. Dabei ist X der Logarithmus der Ligandenkonzentration. Die Standardabweichung der Duplikate und die Konzentration halbmaximaler Aktivität (EC_{50}), wurden aus der Kurve berechnet. Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten (je Duplikate) sind als Mittelwerte \pm SD gezeigt.

Bei der Analyse der Ca^{2+} -Mobilisierung nach OXA-Gabe in den Ösophaguszelllinien, HT-29-Zellen und dem stabilen OXR1-Klon wurde der normierte Kalziumanstieg (*Resp. Max - Resp. Min*) / (*Base Mean*) auf die Positivkontrolle (Mixture bestehend aus ATP 30 μ M, Carbachol 10mM, VIP 1 μ M) bezogen (Positivkontrolle = 1). Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Versuchen gezeigt. Es wurden Duplikate gemessen. Zur statistischen Auswertung wurde ein ANOVA Test mit einem Signifikanzlevel α 0,05 (95 % Konfidenz Interval) mit der GraphPadPrism-Software durchgeführt und dargestellt.

2.2.3.4 Bestimmung der zytoplasmatischen cAMP-Konzentration

Die Aktivierung von GPCRs kann auch zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (zyklisches Adenosinmonophosphat) führen. Nach Ligandenbindung an den GPCR kommt es zum Austausch von GDP zu GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit des heterotrimären G-Proteins. Dies führt zur Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit vom trimären G-Protein. Die nun frei in der Zelle vorliegenden $G\alpha$ -Untereinheiten beeinflussen die Aktivität der Adenylylzyklasen, welche die Herstellung von cAMP aus ATP katalysieren. Die dazu notwendige Konformation der Adenylylzyklasen wird durch $G\alpha_s$ stabilisiert. Dies resultiert in einem intrazellulären Anstieg der cAMP-Konzentration. Umgekehrt inhibieren $G\alpha_i$ -Moleküle die cAMP-Produktion, woraus eine Abnahme der cAMP-Konzentration in der Zelle resultiert. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde mittels des LANCETM cAMP 384 Kits (Perkin Elmer) in dieser Arbeit bestimmt, wobei Forskolin als Positivkontrolle benutzt wurde. Forskolin aktiviert direkt die Adeylatzyklase und führt so zu einem direkten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Dieser Assay basiert auf einem „time-resolved“ Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer-Prinzip (TR-FRET), der Interaktion von zwei räumlich benachbarten Fluorophoren.

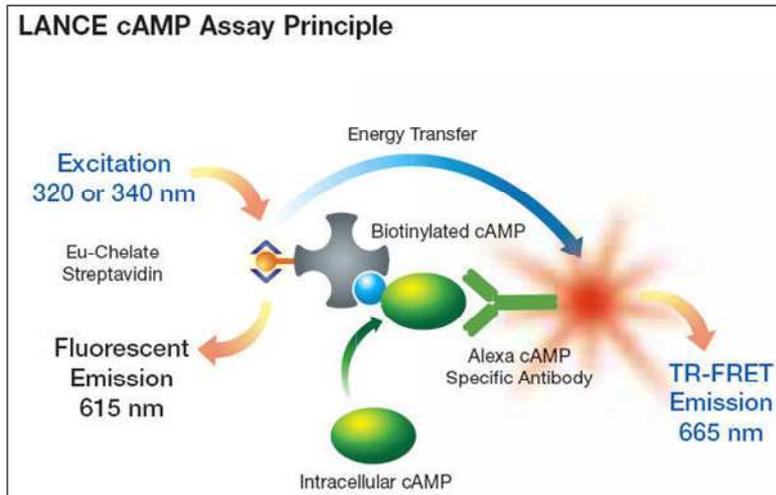


Abb. 9: FRET Prinzip des LANCE cAMP Assays.

Die Messung der intrazellulären cAMP Konzentration mit dem LANCE cAMP Assay basiert auf einem TR-FRET-Prinzip. Hierbei verdrängt endogenes cAMP, das Eu-Chelate- Streptavidin gebundene biotinylierte cAMP vom Alexa-Fluor® 647-gekoppelten spezifischen cAMP- Antikörper wodurch das emittierte FRET-Signal bei 665 nm wird verringert wird. (http://www.perkinelmer.com/CMS/Resources/Images/44-71560_assayprinciple_220x220.jpg.)

Grundlage des Assays ist die Verdrängung von biotinyliertem cAMP (cAMP-b) mit endogenem cAMP. Das biotinylierte cAMP bindet an ein Eu-Chelate-Streptavidin (Eu-S), welches bei einer Wellenlänge von etwa 330 nm angeregt werden kann. Ist kein endogenes cAMP vorhanden, bindet der Eu-S/cAMP-b-Komplex an einen Alexa-Fluor® 647-gekoppelten spezifischen cAMP-Antikörper. Durch die unmittelbare Nähe wird bei Anregung des Eu-Chelate die Emissionsenergie übertragen auf das Alexa –Fluor, welches in einer Emission bei 615 nm (FRET-Signal) resultiert. Endogenes cAMP verdrängt das biotinylierte cAMP vom Antikörper und verringert so das emittierte FRET-Signal. Das Fluoreszenzsignal bei 665 nm ist umgekehrt proportional zur cAMP-Konzentration in der Zelle (Abb. 9).

Für die cAMP-Messung mit dem LANCE™ cAMP 384 Kit werden die Zellen einen Tag vor Versuchsbeginn in Standard-96well-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Vor Versuchsbeginn werden sie für mindestens eine Stunde in einem serumfreien Medium gehalten, um Effekte durch das FCS zu verhindern. Der grundsätzliche Versuchsablauf entspricht dem Herstellerprotokoll. Die Liganden wurden in den angegebenen Konzentrationen in Stimulationspuffer verdünnt und 40 µl/well zu den Zellen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 10 µl 0,5 % TritonX-100 (Permeabilisierung der Zellen) gestoppt. Das Lysat (5 µl) wurde in eine weiße ProxiPlate 384 plus überführt. Nach Zugabe von 5 µl des Alexa-Fluor® 647-cAMP-Antikörpers und einer 30-minütigen Inkubation bei RT wurden 10 µl eines Biotin-markiertem cAMP und Eu-markiertem Streptavidin Gemisches hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Detektion des FRET-Signals erfolgt mit LANCE-Filtern im EnVision (Perkin Elmer). Es wurden jeweils Duplikate gemessen. Es wurde für jede Zelllinie eine Pufferkontrolle (Negativkontrolle) und eine Forskolinkontrolle (Positivkontrolle) mitgeführt. Die Auswertung der Signale bei 665 nm erfolgte wie folgt. Die Signale der Pufferkontrollen wurden von dem Signal bei 665 nm abgezogen. Die so erhaltenen Werte wurden auf die Forskolin-Signale normiert. Die Konzentrations-Wirkungskurve wurde mit GraphPad Prism 5.0 erstellt. Dabei gilt die nichtlineare Regression nach der Formel $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50-X}) * \text{HillSlope})})$.

Die Standardabweichung der Duplikate und die EC_{80} wurden aus der Kurve berechnet. Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente (je Duplikate) sind als Mittelwerte \pm SD gezeigt.

Die statistische Auswertung der Stimulierung des intrazellulären cAMP-Spiegels erfolgte mit einem ANOVA Test mit einem Signifikanzlevel α 0,05 (95 % Konfidenz Interval) mittels der GraphPad Prism-Software.

Die statistische Erhebung der Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels erfolgte mit dem *Paired-t*-Test mit einem Signifikanzlevel α 0,05 (95 % Konfidenz Interval).

2.2.3.5 Biomolekulare Interaktions-Detektion-Technologie (BIND®)

Die biomolekulare Interaktions-Detektion-Technologie (BIND®) ist eine markierungsfreie Detektionsmethode, die biomolekulare Interaktionen misst. Dazu zählen u.a. die Rezeptoraktivierung, die Zelladhäsion und die Protein-Protein-Interaktion.

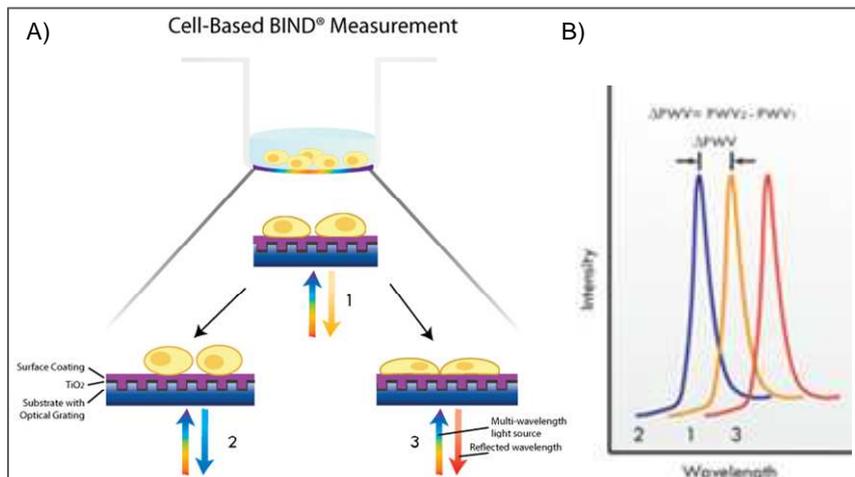


Abb. 10: BIND® Technologie.

Die Interaktions-Detektion-Technologie registriert Massenänderungen (erzeugt durch zelluläre Morphologieänderungen) an der Oberfläche des optischen Biosensors aufgrund von veränderter Wellenlänge des reflektierenden Lichts (PWV). (<http://www.srubiosystems.com/images/WavelengthPrinciplesNumbersCell.jpg>)

Das System besteht aus einem BIND®-Reader und einem BIND®-Biosensor. Der Biosensor befindet sich an der Unterseite einer Mikrotiterplatte. Das Messprinzip basiert auf dem Einsatz von photonischen Kristallen, die als optische Biosensoren fungieren und nur eine bestimmte Wellenlänge des Lichtes reflektieren können („Peak Wavelength Value“ (PWV)). Anheftungen von biochemischem Material oder Zellen (Änderungen in der zellulären Morphologie) auf der Oberfläche des optischen Biosensors verursachen feine Massenänderungen an der Oberflächenumgebung des optischen Biosensors und verändern die Wellenlänge des reflektierenden Lichts (PWV) (Abb. 10 B). Damit können sehr feine Änderungen der Zellmorphologie ohne Verwendung von Markern aufgezeigt werden.

Da die Aktivierung von GPCRs aktinabhängige Änderungen in der zellulären Morphologie induziert, kann diese Technologie zur Charakterisierung und Quantifizierung von zellulären Signalen, die durch GPCRs aktiviert werden, herangezogen werden (Peters & Scott, 2009). Dieses System ist in der Lage, jegliche Rezeptoraktivität abzubilden, die aufgrund einer Peptid-Rezeptor-Bindung induziert wird.

Am Vortag des Experiments wurden die Zellen in speziellen BIND-Platten mit dem integrierten Biosensor ausgelegt. Nach ca. 24 h im Brutschrank wurde das Komplettmedium mit serumfreien Medium ausgetauscht und mindestens 1 h inkubiert. Die Liganden wurden im C1-Waschpuffer mit 0,1 % BSA mit der doppelt angegebenen Konzentration verdünnt. Die Ligandenlösung wurde in eine unsterile 96-well-Platte mit rundem Boden (60 µl pro Well) überführt. Die Zellen wurden mit C1-Waschpuffer gewaschen, und eine Basisreflexion (PWV) wurde mit dem BIND®-Reader gemessen. Die Platte wurde zur Applikation der Liganden aus dem BIND®-Reader entfernt und gleich danach wieder in das Gerät eingesetzt. Die Messung der PWV erfolgte über eine Stunde. Als Positivkontrolle diente ein Peptidmix aus ATP 5µM, Carbachol 0,5 mM, Neurotensin 0,5µM und Bradykinin 1µM. Zu den Negativkontrollen wurde nur der Inkubationspuffer appliziert. OXA wurde in einer Konzentration von 500 nM auf die Zellen gegeben. Die Rohdaten wurden auf die maximale Antwort normiert und die Mittelwerte dreier unabhängiger (je 4 Replikate) Versuche über die Zeit aufgetragen.

2.2.3.6 Bindung und Internalisierung fluoreszenzmarkierter Liganden

Immunfluoreszenzen

Auf Deckgläschen, die in die Wells einer 24-well-Platte eingelegt wurden, wurden ca. 5×10^4 Zellen ausgelegt und mindestens einen Tag wachsen gelassen. Am Tag des Experiments wurden die Zellen mindestens 1 h in serumfreien Medium gehalten. Nach der Entfernung des Mediums wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit den Liganden im Liganden-Durchflusszytometer-Puffer inkubiert. Es wurde mit PBS gewaschen, und anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA /PBS pH 7,0 10 min fixiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS erfolgte das Aufbringen der Deckgläschen auf einen Objektträger mit einem Tropfen Immu Mount. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die Präparate wurden mit dem LSM Axiovert 100 (Zeiss) und der LSM-Image-Browser-Software analysiert. Es wurden Bilder mit einer 630-fachen Vergrößerung aufgenommen. Das IDCC wurde mit einem Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und bei 670 bis 720 nm detektiert. Zur besseren Lokalisation der Signale wurden Durchlichtbilder erstellt und mit den Fluoreszenzbildern überlagert.

Es wurden für jede Zelllinie mehrere Kontrollen mitgeführt. Jede Zelllinie wurde unbehandelt fixiert, um eine Autoimmunfluoreszenz der Zellen auszuschließen. Es wurde eine Kontrolle mit freiem Farbstoff (IDCC) und einem fluoreszenzmarkierten Chemerin 9 „scrambled“ mitgeführt (Chem9sc-IDCC). Alle Peptide wurden wie des OXA-IDCC mit 400 nM eingesetzt. Diese Kontrollen sollten eine unspezifische Bindung des freien Farbstoffs bzw. eines fluoreszenzmarkierten Peptids anzeigen. Für eine weitere Kontrolle der spezifischen Bindung wurde außerdem noch eine Verdrängung des fluoreszenzmarkierten OXA mit einer 25-fach erhöhten Konzentration an nicht markiertem OXA bzw. dem selektiven OXR1 Antagonisten SB-334867 vorgenommen.

Durchflusszytometer

Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurde in diesen Versuchen eine Bindung bzw. Aufnahme des mit IDCC markierten OXA in die Zellen detektiert. Am Vortag des Experiments werden die Zellen in eine 24-Well-Platte ausgelegt. Am Experimententag werden die Zellen zunächst mindestens 1 h serumfrei gehalten. Es erfolgte die Peptidinkubation für 30 min bei 37°C in einem Liganden-Durchflusszytometer-Puffer.

Es wurde jeweils eine Pufferkontrolle und eine Kontrolle nur mit dem freien Farbstoff IDCC mitgeführt. Als späteren Richtwert für die Auswertung wurde eine Probe mit dem Chemerin 9-„*scrambled*“ IDCC Peptid (Chem9sc-IDCC) inkubiert. Alle Peptide wurden wie das OXA-IDCC mit 400 nM eingesetzt. Zur Verdrängung der Peptidbindung wurde (wenn nicht anders angegeben) eine 25-fach erhöhte Konzentration an OXA und dem selektiven OXR1-Antagonisten SB-334867 eingesetzt. Die Substanzen, mit denen verdrängt wurde, wurden in den entsprechenden Konzentrationen 10 min auf den Zellen vorinkubiert. Dann erfolgte die 30-min-Inkubation mit OXA-IDCC und OXA bzw. SB-334867.

Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin von der Oberfläche abgelöst und mit kaltem PBS gewaschen. Nach einer 10-min-Fixierung bei Raumtemperatur mit 4 % PFA/PBS pH 7,0 wurde nochmals mit PBS gewaschen und die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen. Bis zur Messung, die immer am selben oder am Tag darauf erfolgte, wurden die Zellen im Dunkeln bei 4°C gelagert.

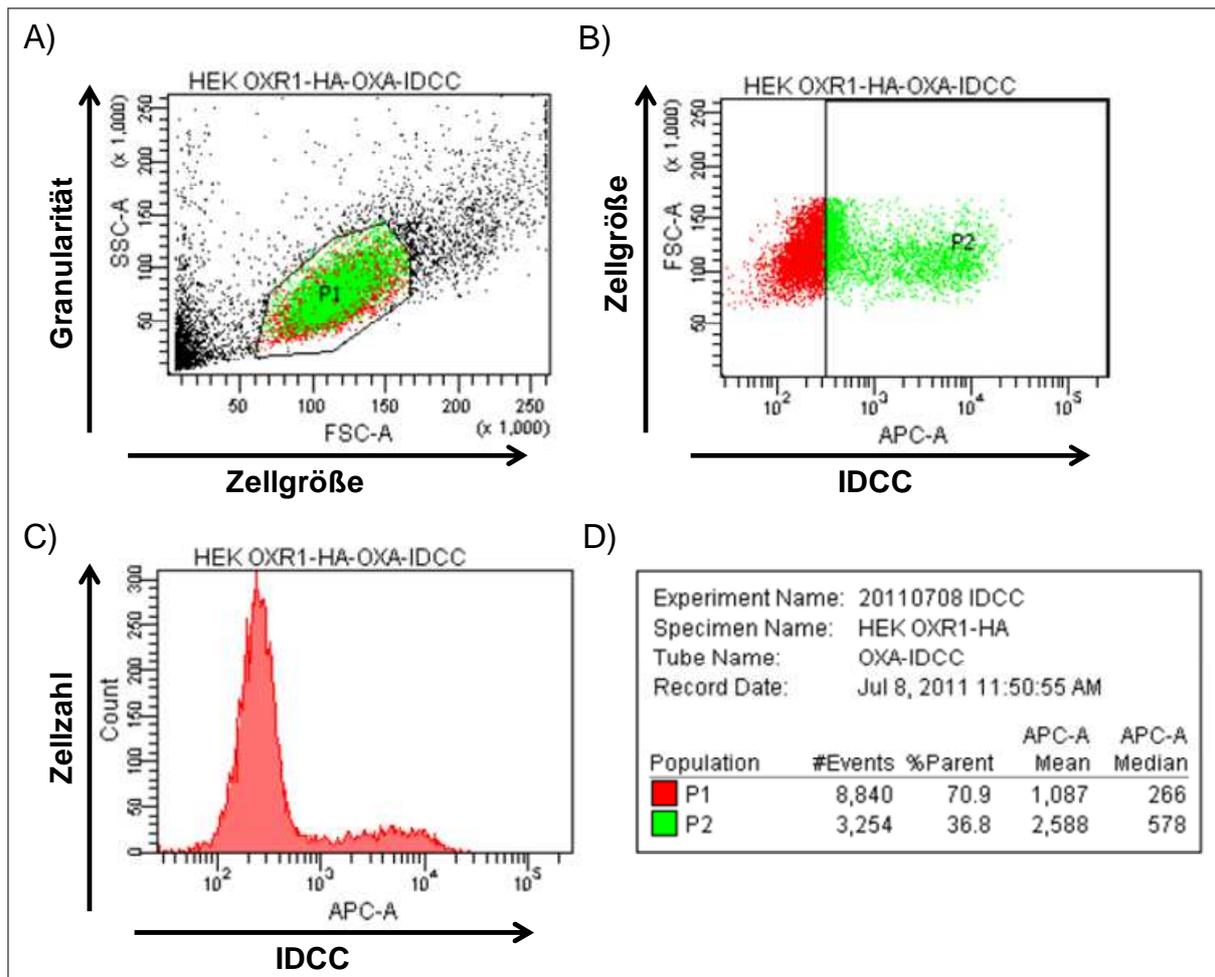


Abb. 11: Beispielmessung und Auswertung einer Durchflusszytometrischen Analyse von transient mit dem OXR1 transfizierten Hek293a-Zellen. A-C) mit OXA-IDCC inkubierte transient transfizierte Hek293a-Zellen. A) dot Plot von allen gemessenen Zellen. Zu sehen ist die Größe (FSC) gegen die Granularität (SSC) der Zellen. B) dot Plot von allen in A) mit dem Gate (P1) markierten Zellen. Zellzahl gegen die IDCC Fluoreszenz. C) Histogramm der Zellen in Gate (P1). Histogramme zeigen die Zellzahlen gegen die IDCC Fluoreszenz. D) Statistische Auswertung.

Die Aufnahme der Zellen wurde mittels des FACSCanto durchgeführt; die Messung und auch die Auswertung erfolgten mit der FACSDiva-Software (BD). Der FACSCanto hat drei Laser und ist in der Lage, acht Fluoreszenzen zu detektieren. In dieser Arbeit wurde nur der Argonlaser für die Aufnahme des Streulichts und der Helium-Neon-Laser mit der Anregung 633 nm und dem Filterrange 650 nm bis 670 nm eingesetzt. Dies gewährleistete die Anregung und Aufnahme der Emission des IDCC.

In Abb. 11 ist eine Beispielmessung gezeigt. Um Zelltrümmer auszugrenzen wurde zunächst auf die zu analysierende Population im FSC und SSC ein *Gate* (P1) (rot) gesetzt (Abb. 11 A). Diese markierte Population 1 (rot) wird zunächst in einem weiteren *dotPlot* B), welches die Zellzahl gegen die IDCC-Fluoreszenz anzeigt, angewendet. In diesen Plot wird eine weitere Population P2 (grün) markiert, die mit der Population aus P1 (rot) verknüpft ist. Diese Population P2 (grün) enthält die IDCC-positiven Zellen. Dieses *Gate*, welches die Population 2 (grün) eingrenzt, wird anhand der

Zellen gelegt, die mit dem Chem9sc-IDCC inkubiert wurden (nicht gezeigt). Dieser *dotPlot* gibt Information über die IDCC-positiven Zellen in Prozent der Gesamtzellen in P1. Weiter wird die Population 1 (rot) in einem Histogramm (Zellzahl gegen IDCC-Fluoreszenz) betrachtet (C). Es wurden die IDCC-positiven Zellen in Prozent (P2) der Population 1 und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Population 1 (APC-A Mean) aus der statistischen Auswertung (D) für die weitere statistische Erhebung herangezogen. Ergebnisse von zwei bis fünf unabhängigen Versuchen werden als Mittelwerte \pm SD gezeigt.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Immunologische Methoden

Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbung eignet sich sehr gut, um die Lokalisation von Proteinen in Zellen oder Geweben zu zeigen. Zur Detektion des zu untersuchenden Proteins wird ein primärer Antikörper benötigt, der spezifisch das Protein erkennt.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird ein sekundärer Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, eingesetzt. Dieser sekundäre Antikörper richtet sich gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers. Die Auswertung der Immunfluoreszenz erfolgte an einem konfokalen Laserscannmikroskop. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurde in dieser Arbeit benutzt, um die Expression eines transient transfizierten Gens und die endogene Expression einer Zielstruktur nachzuweisen. Zunächst wurden Deckgläschen in die Wells einer 24-well-Platte eingelegt, auf diese wurden ca. 5×10^4 Zellen ausgelegt und mindestens einen Tag inkubiert. Nach der Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Aceton/Methanol (1:1) 2 min fixiert. Anschließend wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit 5 % BSA in PBS für 30 min abgeblockt. Der antigenspezifische primäre Antikörper wurde für 24 h bei 4°C in der entsprechenden Verdünnung in 5 % BSA-PBS-Lösung (100 μ l/Deckgläschen) auf die Zellen gegeben. Nach drei Waschschritten mit PBS (3 x 5 min) erfolgte eine einstündige lichtgeschützte Inkubation mit dem sekundären Fluorophor gekoppelten Antikörper. Es folgte erneutes Waschen mit PBS. Die Deckgläschen wurden mit dem Zellrasen nach unten auf einen Tropfen ImmuMount auf Objektträger gelegt und bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Die Auswertung und Digitalisierung der Immunfluoreszenzen erfolgte am Konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (LSM510), welches drei Laser mit den Wellenlängen 488 nm, 543 nm und 633 nm enthält, die zur Anregung zur Verfügung stehen. Bei einer Wellenlänge von 488 nm wurde das Fluorophor Cy2 angeregt und emittierte Licht zwischen 505 bis 550 nm (grün). Die Wellenlänge von 543 nm führte zur Anregung des Fluorophors Cy3, welches dadurch Licht der Wellenlänge 650 nm emittierte (rot). Zur besseren Lokalisation der Signale wurden Durchlichtbilder erstellt, die mit den

Fluoreszenzbildern überlagert wurden. Um Eigenfluoreszenz der Zellen bzw. Kreuzreaktionen der Antikörper ausschließen zu können, wurden Kontrollen ohne primären Antikörper mitgeführt.

Immunhistochemie an Kryoschnitten

Die Lokalisation von Proteinen in Gewebe wurde mittels der Immunhistochemie nachgewiesen. Hierzu wurden mithilfe eines Gefriermikrotoms 10 µm dünne Gewebeschnitte hergestellt. Diese wurden fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen das zu detektierende Protein inkubiert. Anschließend wurde der primäre AK über einen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen.

Um den Orexinrezeptor (OXR1) in humanem Gewebe zu lokalisieren, wurden die Kryoschnitte zunächst mit einem Methanol/Aceton Gemisch (1:1) für 2 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS wurden die Gewebeschnitte für 10 min in 3 % H₂O₂ blockiert. Anschließend erfolgte weiteres zweimaliges Waschen in PBS, gefolgt von einem Permeabilisierungsschritt mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 10 min. Es folgte eine Avidin/Biotin-Blockierung (Dako) für jeweils 20 min. Nach weiterem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit 2-prozentigem Ziegen Serum in PBS für 30 min blockiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Schnitte über Nacht mit dem OXR1-Antikörper (1 µg/ml) bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut gewaschen und ein biotinylierter Sekundärantikörper für 30 min RT auf die Schnitte gegeben. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit ABC-Komplex laut Herstellerangaben (Dako) für 30 min bei RT. Der Antikörper-Komplex aus primären und sekundärem Antikörper zeigte sich anhand einer braunen Färbung nach einer 10-minütigen Inkubation mit dem Kit „Liquid DAB+ Substrat Chromogen System“ (Dako). Die Reaktion wurde mit H₂O gestoppt. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Gegenfärbung mit Hämalaun. Hämalaun färbt die Zellkerne an und hilft so den Ort der OXR1-Expression besser lokalisieren zu können. Nach dem Eindecken in Glyceringelantine und Trocknen der Gewebeschnitte wurden die Schnitte im Dunkeln bei RT gelagert. Die Analyse und Digitalisierung erfolgte am Axiophot-Mikroskop (Zeiss) mit der Axiovision release v4.7 Software.

Um sicher zu stellen, dass die IHC-Methode mit dem OXR1-Antikörper eine spezifische Bindung des Antikörpers an das OXR1-Epitop zeigt, wurde eine Verdrängung der spezifischen Bindungsstellen im OXR1-Antikörper mit dem immunogenen Peptid durchgeführt. Hierzu wurde der Antikörper eine Stunde bei 37°C mit einem 1000-fachen Überschuss an immunogenem Peptid inkubiert.

Die Expansion und Intensität der Färbung wurde von zwei Experimentatoren unabhängig begutachtet und beurteilt. Die Färbeintensität wurde auf einer Skala von Null (keine Färbung) bis Drei (sehr starke Färbung) und die Expansion (gefärbte Tumorzellen in Prozent) von 0 % bis 100 % eingeordnet. Daraus wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

2.2.5 Tierexperimentelle Methoden

2.2.5.1 Versuchstiere

Die Haltung der Tiere und die Experimente erfolgten in der Tierhaltung im Campus Virchow Klinikum der Charité. Als Model für die gerichtete NIR-Bildgebung wurden Nacktmäuse (NMRI nu/nu Mäuse der Firma Charles River) im Alter von 3 bis 6 Monaten verwendet.

2.2.5.2 Kleintierbildgebung - Nah-Infrarotfluoreszenz (NIR) Bildgebung

Zunächst wurden subkutane Tumore mittels humaner Tumorzelllinien in den Tieren generiert. Hierzu wurden 5×10^6 Zellen subkutan in beide Flanken der Mäuse inokuliert. Nach erfolgreichem Wachstum eines subkutanen Tumors, wurde eine Kleintierbildgebung durchgeführt.

Den Versuchstieren wurde dazu das OXA-IDCC intravenös über die Schwanzvene injiziert (2 nmol) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Fluoreszenzintensitäten mittels des LI-COR Pearl Imagers im 700-nm-Kanal untersucht. Für den Untersuchungszeitraum von zwei Minuten wurden die Tiere mit Hilfe von Isoflurangas narkotisiert. Die Auswertung des Fluoreszenzsignals konnte nach dem Versuch an der gerätespezifischen Software erfolgen.

2.2.6 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (\pm SD) angegeben, wenn nicht anders beschrieben. Es wurden immer drei unabhängige Experimente zusammengefasst, wenn nicht anders verzeichnet.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde, wenn nicht anders angegeben, ein ANOVA Test mit einem Signifikanzlevel α 0,05 (95 % Konfidenz Interval), durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ akzeptiert ($P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***). Die Auswertung und Darstellung erfolgte mit GraphPad-Prism5-Software.

3 Ergebnisse

3.1 Antikörpervalidierung

3.1.1 Detektion des Orexinrezeptors 1 (OXR1) im überexprimierten System

Zunächst sollte die Expression des OXR1 in unterschiedlichsten Tumoren und Normalgeweben des Gastrointestinaltrakts untersucht werden. Um die Expression untersuchen zu können, wurde ein Antikörper benötigt, der spezifisch und zuverlässig den Rezeptor detektiert.

Dazu wurden verschiedene kommerziell zu erwerbende Antikörper evaluiert. Als Positivkontrolle dienten mit dem pcDNA3.1-Plasmid, in welches die DNA-Sequenz des OXR1 mit einem zusätzlichen HA-Epitop integriert wurde, transfizierte eukaryotische Zelllinien (2.2.2.2).

Dazu wurden die Antikörper, wie in Abb. 12 A zu sehen ist, im überexprimierten System getestet. Abb. 12 A zeigt in Rot eine deutliche OXR1-Färbung der transient transfizierten Hek293a-Zellen. Auch mittels des α HA-Antikörpers ist eine deutliche Färbung zu sehen (grün). In beiden Fluoreszenzkanälen sind positive und negative Zellen nebeneinander zu sehen, was in einer transienten Transfektion zu erwarten ist. Es ist eine deutliche Kolo-kalisation der beiden Färbungen zu erkennen (gelb). Dies war ein starker Hinweis für eine spezifische Bindung des OXR1-Antikörpers an den Rezeptor. Die Färbungen sind an den Membranen der Zellen konzentriert, was für einen GPCR zu erwarten ist. In der mit Leervektor pcDNA3.1 transfizierten Kontrolle (Abb. 12 A) ist keine Fluoreszenz zu erkennen.

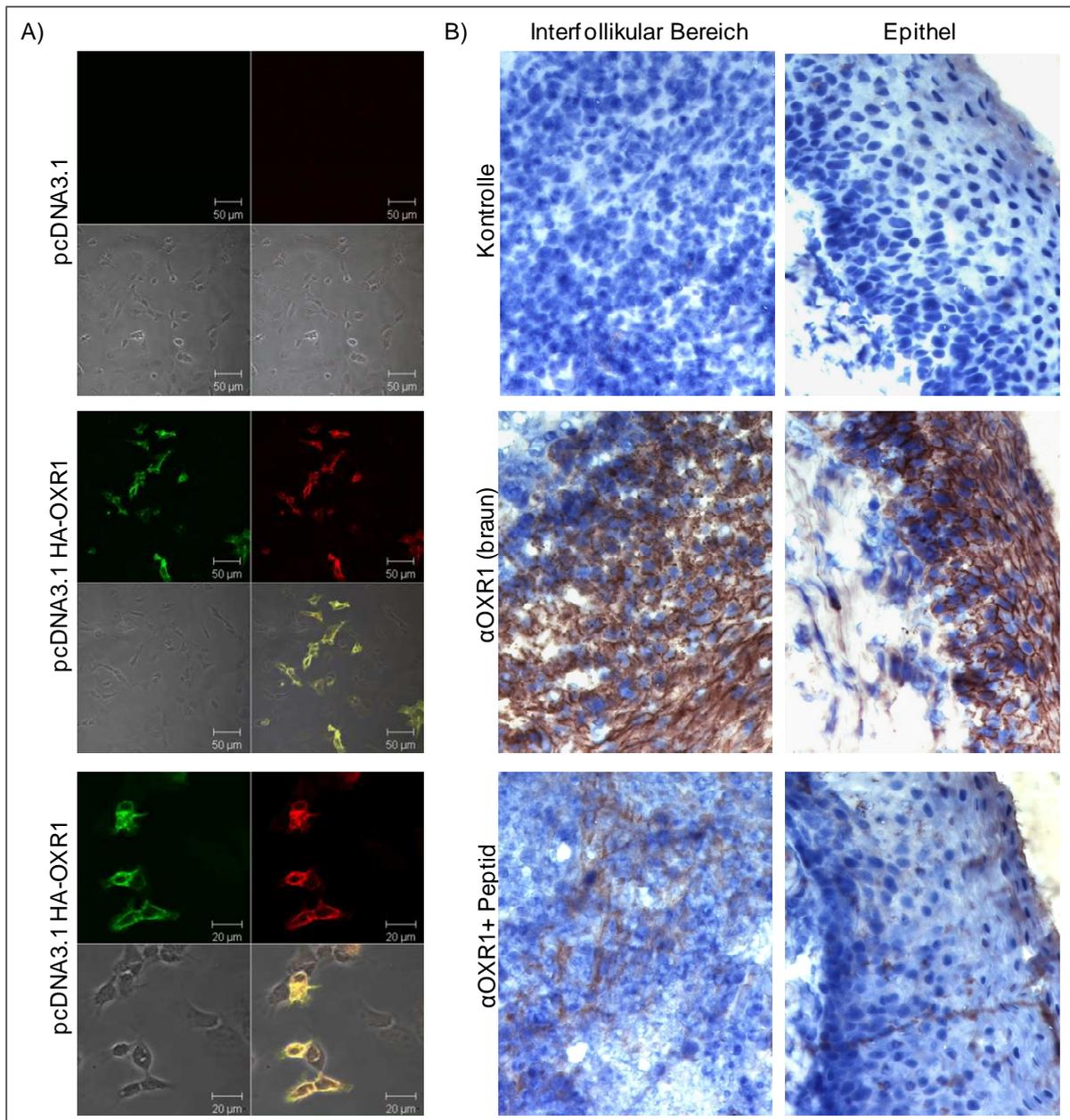


Abb. 12: Validierung des OXR1-Antikörpers. A) Transient transfizierte Hek293a-Zellen mit pcDNA3.1 (Kontrolle) und pcDNA3.1-HA-OXR1-Plasmid. Alle Zellen wurden mit dem OXR1-Antikörper, der mittels einem Cy3 markierten Esel- α Ziege-Antikörpers gefärbt (rot) wurde, und dem HA-Tag Antikörper, der mit dem Cy2-markierten Esel- α Maus-Antikörpers gefärbt (grün) wurde, behandelt. Die Bilder wurden mit dem LSM aufgenommen. B) Kryoschnitte einer gesunden humanen Tonsille wurden mit dem OXR1-Antikörper gefärbt und mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die Spezifität des OXR1-Antikörpers wurde durch eine Verdrängung der Antikörper-Bindungsstellen mit dem immunogenen Peptid untersucht. Die Bilder wurden mit dem Axiophot (Zeiss) mit einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen. Kontrolle ohne Primärantikörper. α OXR1 Antikörper-Färbung. α OXR1+Peptid Antikörper-Färbung nach Vorinkubation mit dem immunogenen Peptid.

Weiter sollte der OXR1-Antikörper auf menschlichem Gewebe getestet werden. Dies erfolgte, um die Spezifität des Antikörpers in Gewebefärbungen einschätzen zu können und somit dessen Gebrauch für weitere Gewebefärbungen zu legitimieren.

Die Etablierung des OXR1-Antikörpers im Gewebe wurde an der Tonsille vorgenommen. Das Plattenepithel der Tonsille zeigte eine starke spezifische Färbung (Abb. 12 B). Die Gewebeschnitte, die mit dem Antikörper gefärbt wurden, zeigten eine deutliche Braunfärbung des Plattenepithels und des interfollikularen Bereichs. Auch hier war wieder eine deutliche Membranfärbung der Zellen sichtbar. Zusätzlich zur Negativkontrolle, welche kein Signal zeigte, wurde eine Blockierung der Antikörper-Bindungsstellen mittels des immunogenen Peptids durchgeführt, um die Spezifität des Antikörpers zu zeigen. Diese Blockierung resultierte in einem starken Rückgang der Färbung, was ein deutlicher Hinweis auf eine hohe Spezifität des Antikörpers war.

Eine weitere Absicherung für die Gewebefärbungen wurde mit einem zweiten Antikörper erreicht. Um sicherzustellen, dass der Santa Cruz OXR1-Antikörper auch spezifisch den OXR1 anfärbt, wurde ein unabhängig erzeugter Antikörper aus einer anderen Quelle herangezogen. Die Färbemuster beider Antikörper wurden direkt im Gewebe verglichen (Abb. 13 und 14). Die Abb. 13 und 14 zeigen ein identisches Färbemuster beider Antikörper, was auf eine spezifische Bindung des Antikörpers an den Rezeptor schließen ließ. Daraufhin wurde in folgenden Versuchen der OXR1-Antikörper von Santa Cruz verwendet.

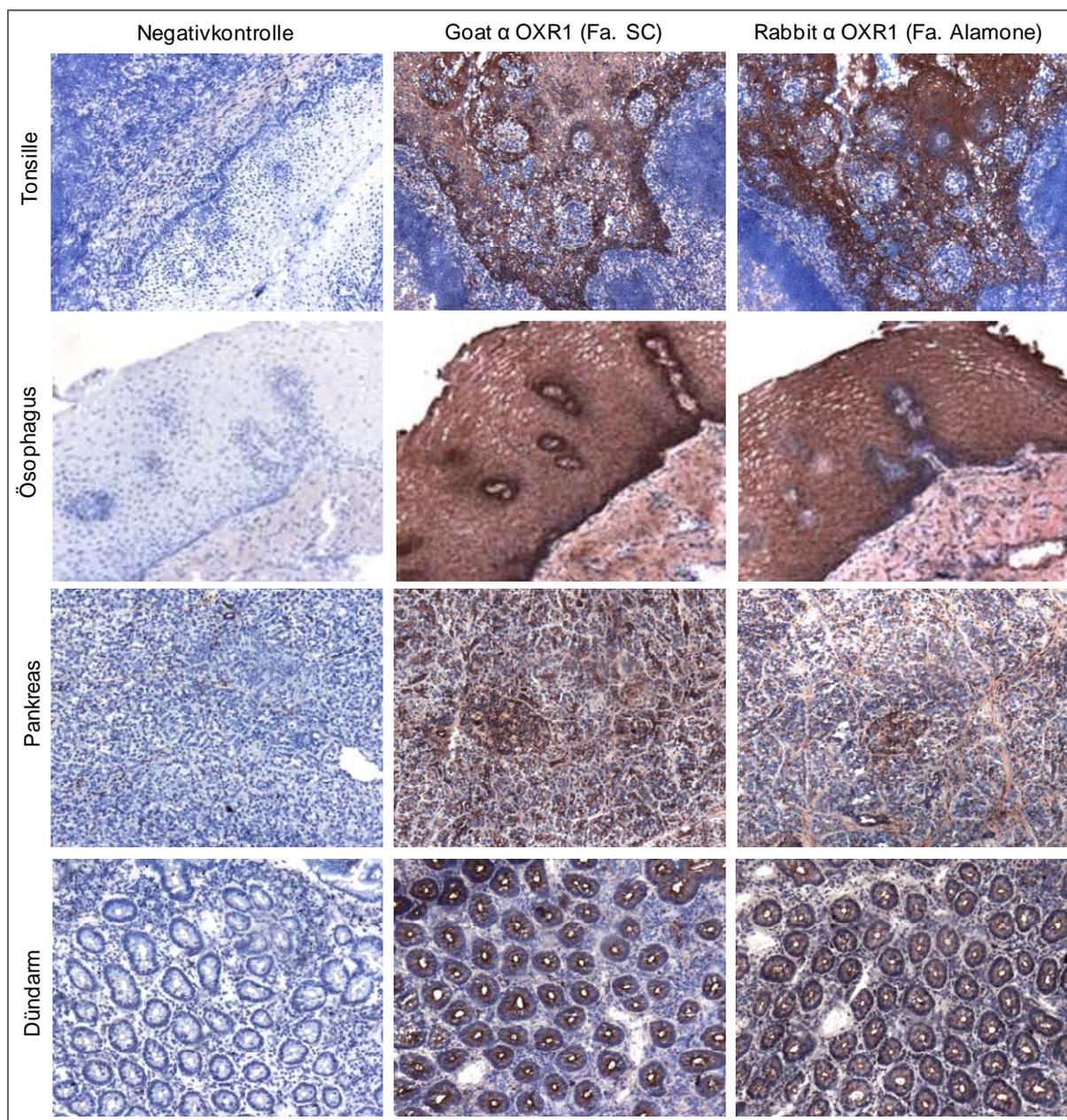


Abb. 13: Expression des OXR1 im humanen Gewebe. Kryoschnitte wurden mit dem OXR1-Antikörper (Santa Cruz) und dem OXR1-Antikörper (Alomone) gefärbt und mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. A) Die Negativkontrollen wurden nur mit Puffer ohne OXR1-Antikörper inkubiert. Die Bilder wurden mit dem Axiophot (Zeiss) mit einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen.

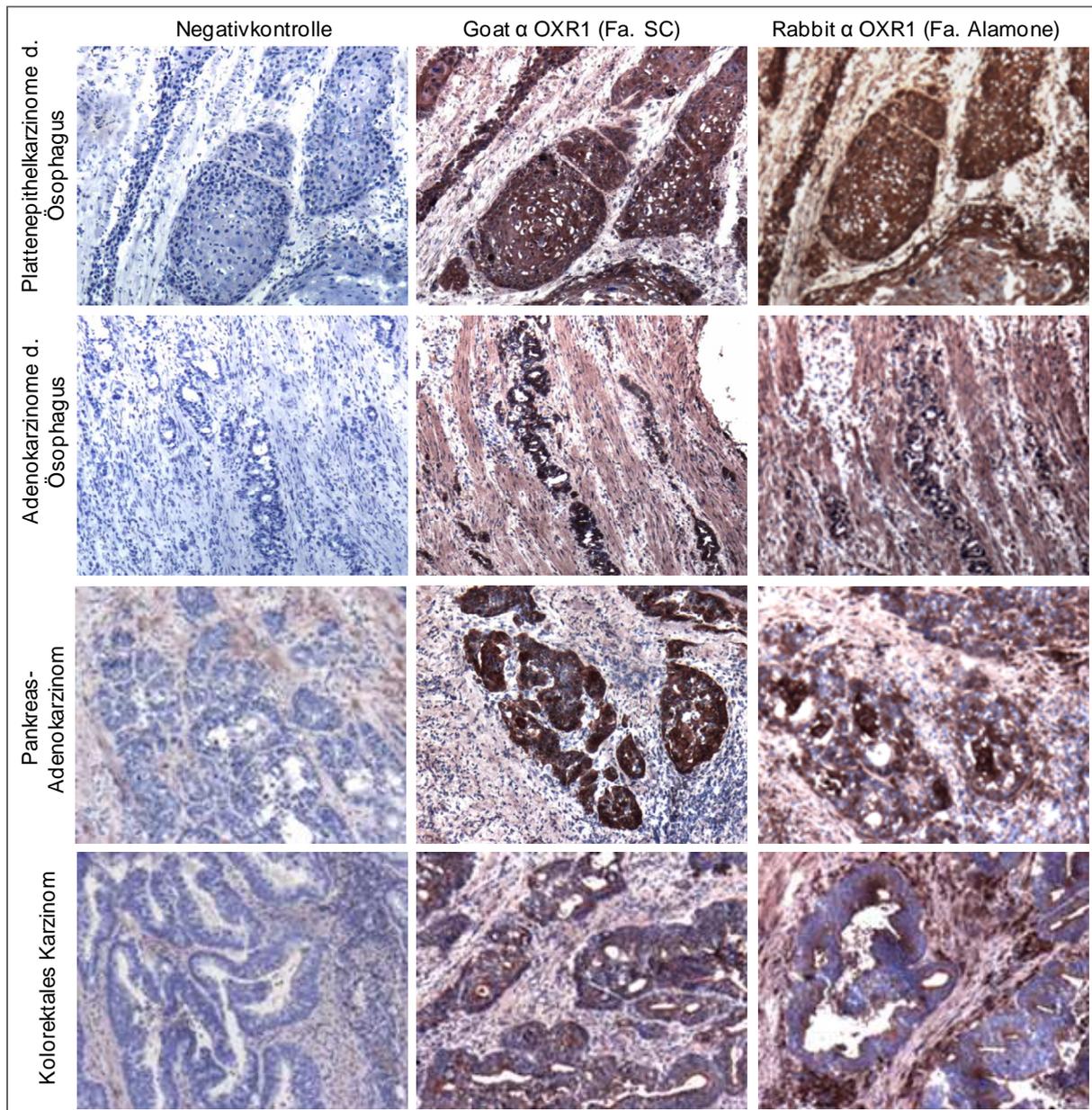


Abb. 14: Expression des OXR1 im humanen Gewebe. Kryoschnitte wurden mit dem OXR1-Antikörper (Santa Cruz) und dem OXR1-Antikörper (Alomone) gefärbt und mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. A) Die Negativkontrollen wurden nur mit Puffer ohne OXR1-Antikörper inkubiert. Die Bilder wurden mit dem Axiophot (Zeiss) mit einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen.

3.2 Expressions-Charakterisierung

3.2.1 Expression des OXR1 in humanen Tumoren des Gastrointestinaltrakts

Nachdem die Etablierung der Gewebefärbung mittels des OXR1-Antikörpers abgeschlossen war und die Bindung des Antikörpers als spezifisch gezeigt werden konnte, wurden Kryogewebeschnitte unterschiedlicher humaner gastrointestinaler Tumoren gefärbt. Um eine eventuelle Überexpression des Rezeptors in den Tumoren abschätzen zu können, wurde jeweils auch Normalgewebe im Vergleich mit gefärbt. Bei jedem Färbeansatz wurde sowohl eine Negativkontrolle, indem der OXR1-Antikörper durch eine Pufferlösung ersetzt wurde, als auch eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente humanes Tonsillengewebe (Abb. 13).

In der Färbung des gesunden humanen Tonsillengewebes mit dem OXR1-Antikörper war eine deutliche Braunfärbung der Zellen im interfollikularen Bereich zu sehen. Teilweise war eine Membranfärbung zu detektieren (Abb. 13). In den Negativkontrollen war keine Färbung zu detektieren.

Die Abb. 15 zeigt die Färbung eines gesunden Magengewebes (Magenfundus) und eines Magenkarzinoms. In der Negativkontrolle des Normalgewebes war eine Hintergrundfärbung zu sehen. Die Färbung in den α OXR1 behandelten Gewebeschnitten war etwas stärker, jedoch waren keine spezifisch angefärbten Strukturen zu erkennen (Abb. 15, obere Reihe). Die Negativkontrolle des Magenkarzinoms zeigte keine Anfärbung. Hingegen war eine deutliche Braunfärbung einiger Zellen des Magenkarzinoms in der α OXR1-Färbung zu sehen (Abb. 15, untere Reihe). Teilweise war eine deutliche Membranfärbung der Zellen zu detektieren.

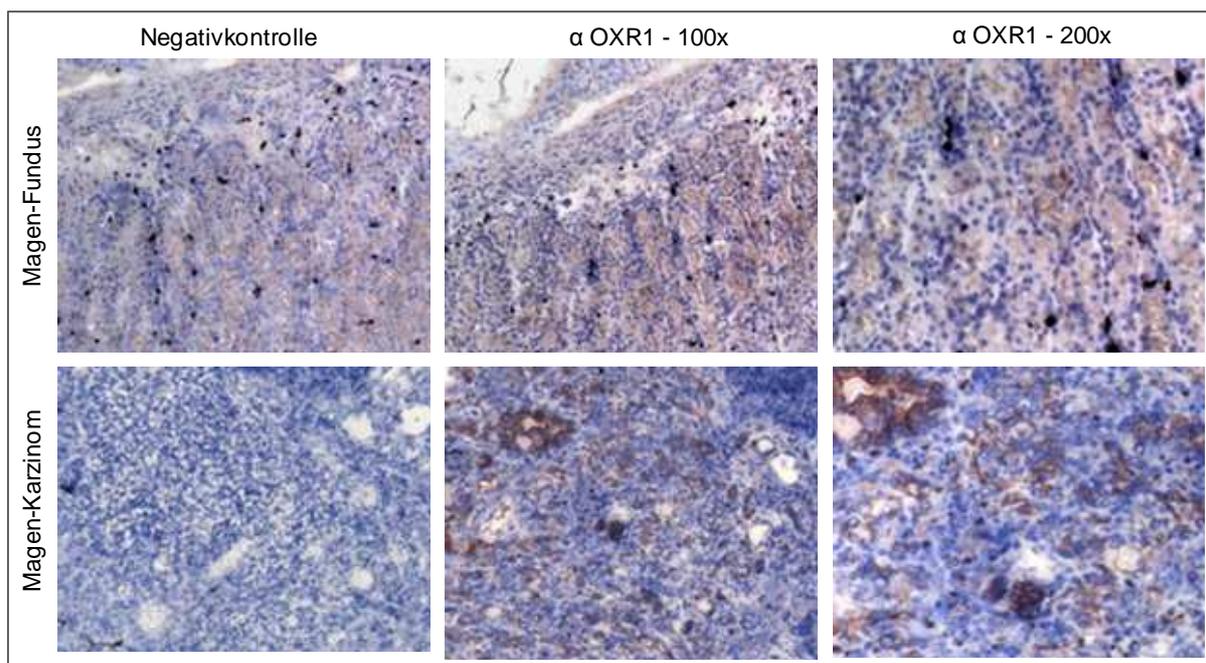


Abb. 15: Expression des OXR1 in humanem Tumorgewebe und Normalgewebe des Magens.

Kryoschnitte wurden mit dem OXR1-Antikörper (Santa Cruz) gefärbt und mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Negativkontrollen wurden ohne OXR1-Antikörper inkubiert. Die Bilder wurden mit dem Axiophot (Zeiss) aufgenommen.

In Abb. 16 ist die Färbung eines gesunden Dünndarmgewebes und eines neuroendokrinen Tumors des Ileums dargestellt. In der Negativkontrolle des epithelialen Normalgewebes war eine Braunfärbung von einzelnen Zellen zu sehen. Diese unspezifische Färbung wurde in mehreren Schnitten des Darms beobachtet, die aus einer Anfärbung von Makrophagen mittels des sekundären Antikörpers im Gewebe resultieren könnten. Diese Braunfärbung fand sich in den mit α OXR1 gefärbtem Gewebe wieder. Zusätzlich war eine Braunfärbung der äußeren Epithelzellen zu erkennen.

Die Negativkontrolle der gesunden Submukosa mit Plexus war nicht gefärbt. Im Vergleich hierzu erkennt man eine deutliche Färbung des submukosalen Plexus in den mit α OXR1 gefärbtem Gewebe wieder. Das Tumorgewebe zeigte in den α OXR1 behandelten Gewebeschnitten eine Braunfärbung im Vergleich zur Kontrolle, es war eine moderate, zytoplasmatisch diffuse Färbung.

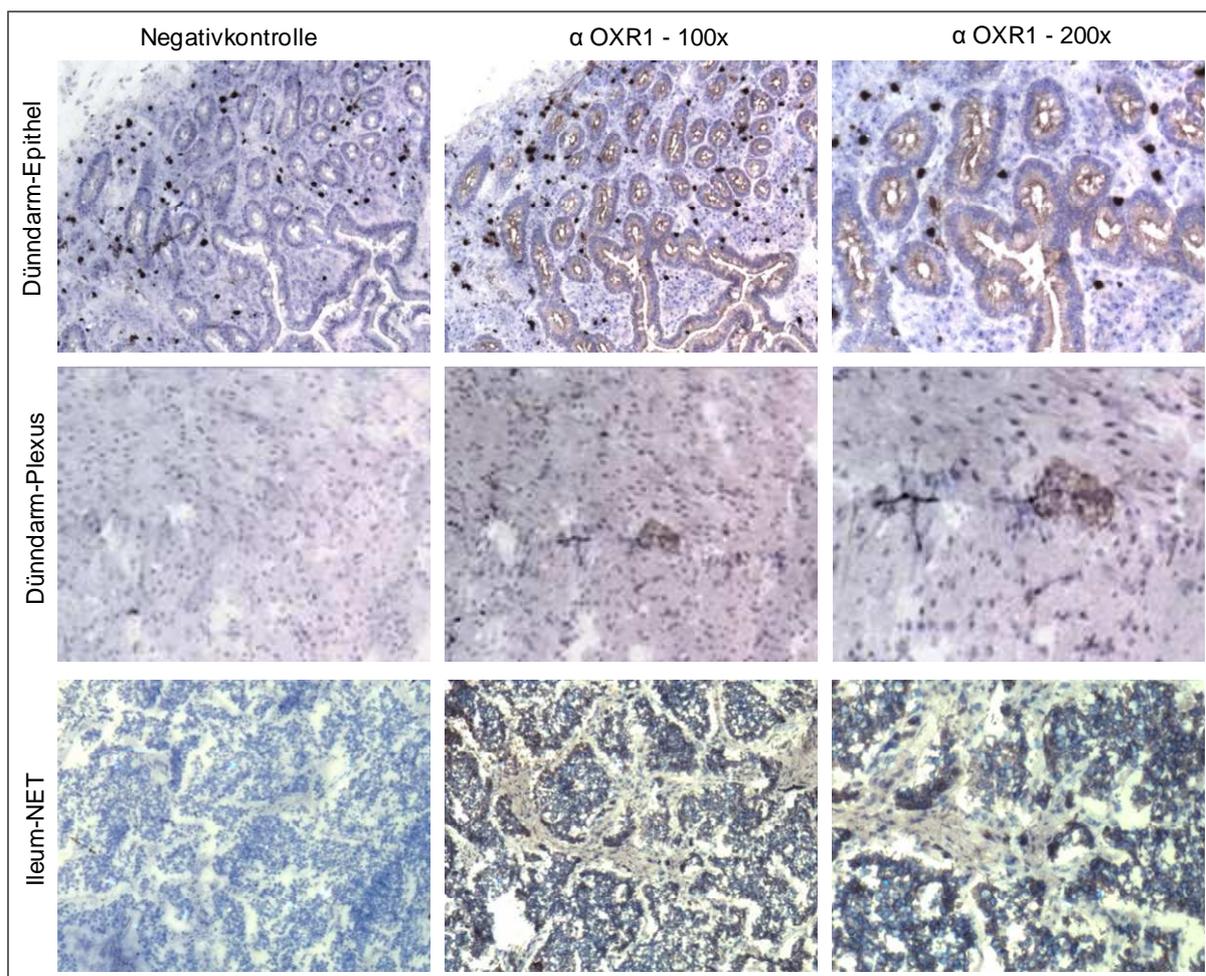


Abb. 16: Expression des OXR1 in humanem Tumorgewebe und Normalgewebe des Dünndarms.

Kryoschnitte wurden mit dem OXR1-Antikörper (Santa Cruz) gefärbt und mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Negativkontrollen wurden ohne OXR1-Antikörper inkubiert. α OXR1 Antikörper-Färbung. Die Bilder wurden mit dem Axiophot (Zeiss) aufgenommen.

Abb. 17 zeigt die Expression des OXR1 im Normalgewebe des Dickdarms und im kolorektalen Karzinom. Die Epithelzellen des Normalgewebes zeigten eine Braunfärbung. Die Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms waren lumenwärts gefärbt. Teilweise war eine Membranfärbung der Tumorzellen zu sehen. Die Kontrollen waren nicht gefärbt.

Das Färbemuster des gesunden Dün- und Dickdarms war identisch. Bei beiden Geweben waren die Epithelzellen gefärbt.

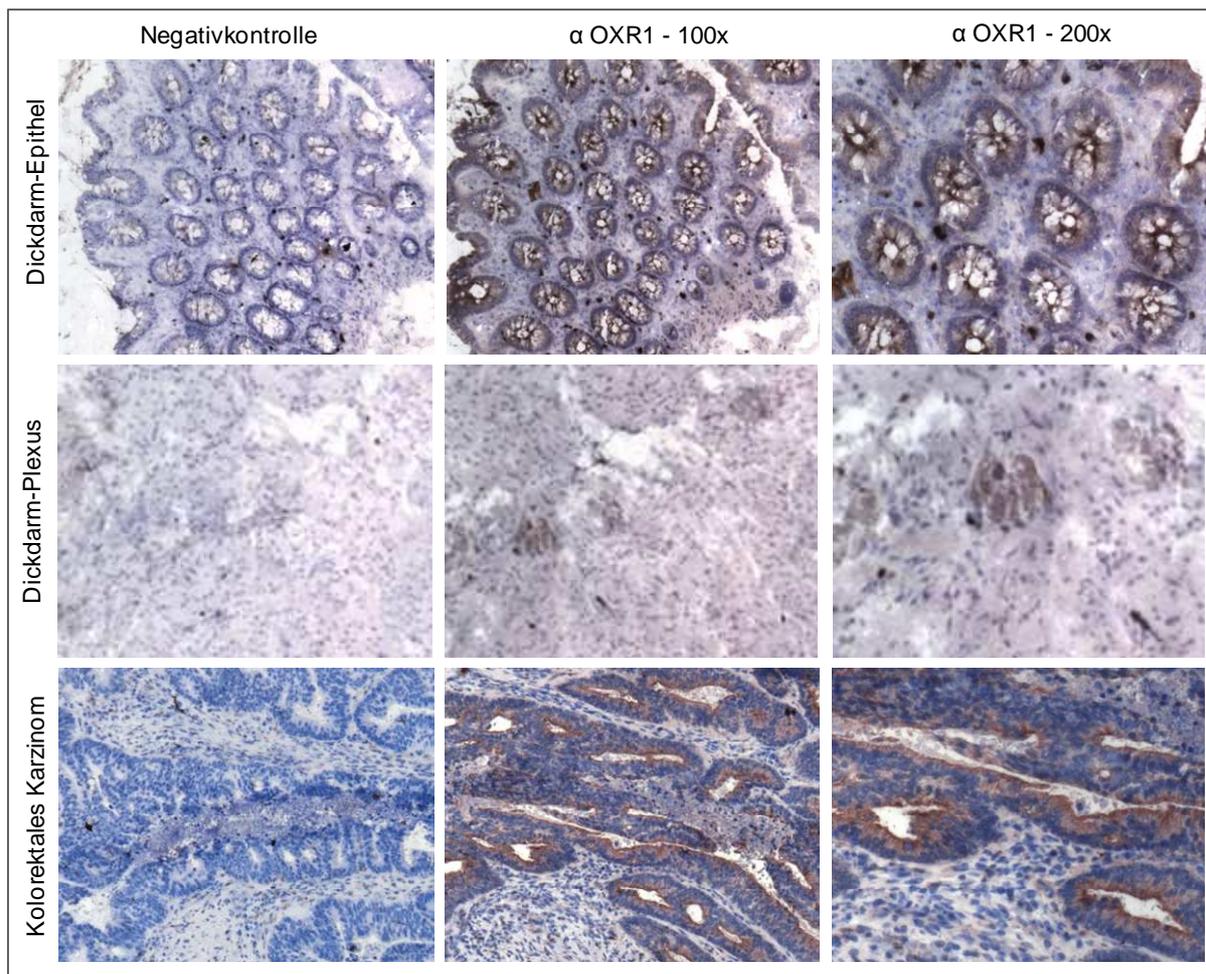


Abb. 17: Expression des OXR1 in humanem Tumorgewebe und Normalgewebe des Dickdarms.

Kryoschnitte wurden mit dem OXR1-Antikörper (Santa Cruz) gefärbt und mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Negativkontrollen wurden ohne OXR1-Antikörper inkubiert. α OXR1 Antikörper-Färbung. Die Bilder wurden mit dem Axiophot (Zeiss) aufgenommen.

Das Gewebe eines gesunden humanen Pankreas diente bei der Antikörpervalidierung, genauso wie die Tonsille, als Positivkontrolle, da die Expression des Rezeptors in den Inselzellen in anderen Spezies wie der Ratte und dem Meerschweinchen bekannt war (Kirchgessner & Liu, 1999). Die Abb. 18 zeigt die OXR1-Färbung eines gesunden Pankreasgewebes, ein Pankreas-Adenokarzinom und einen neuroendokrinen Tumor des Pankreas. Im Normalgewebe des Pankreas waren, wie erwartet, die Inselzellen angefärbt (Pfeil). Auch einzelne Azini und Gänge sowie Endothelzellen waren im Normalgewebe gefärbt. Das Pankreaskarzinom zeigte eine starke bis mittlere Färbung der Tumorzellen. Im neuroendokrinen Tumor waren nur vereinzelte Tumorzellen gefärbt, diese wiesen aber eine starke Färbung auf. Sämtliche Negativkontrollen zeigten keine Färbung.

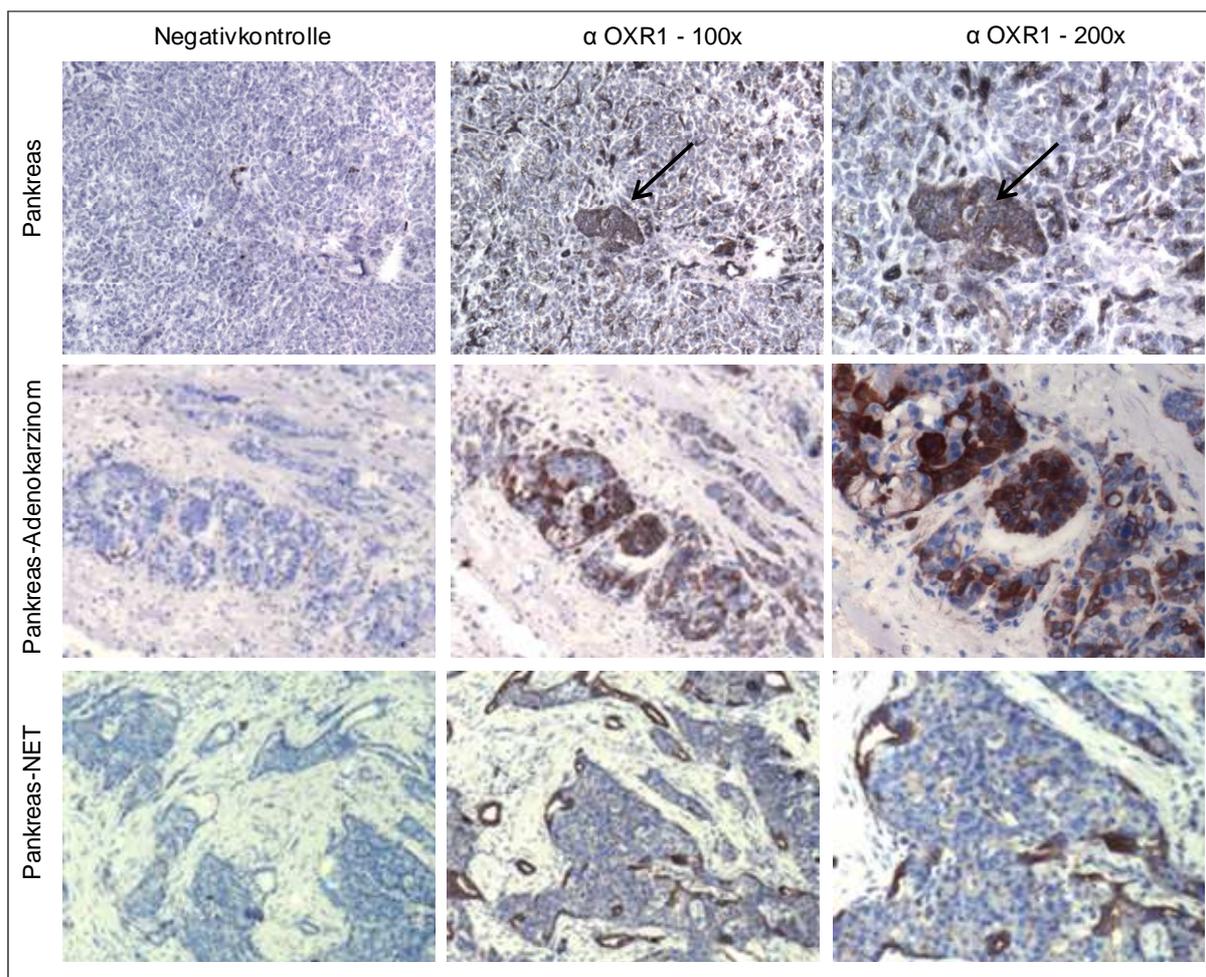


Abb. 18: Expression des OXR1 in humanem Tumorgewebe und Normalgewebe des Pankreas.

Kryoschnitte wurden mit dem OXR1-Antikörper (Santa Cruz) gefärbt und mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Negativkontrollen wurden ohne OXR1-Antikörper inkubiert. α OXR1 Antikörper-Färbung. Die Bilder wurden mit dem Axiophot (Zeiss) aufgenommen.

Der OXR1 ist im Plattenepithel des ösophagealen Normalgewebes exprimiert, wobei eine deutliche Membranfärbung der Plattenepithelzellen zu erkennen war (Abb. 19). In einigen Präparaten war außerdem die Expression des OXR1 in der Basalmembran sehr stark (Abb. 19, Pfeil). Die Adenokarzinome des Ösophagus zeigten eine leichte bis mittelstarke Braunfärbung der Tumorzellen, hierbei war wiederum eine Membranfärbung zu erkennen. Die Plattenepithelkarzinome zeigten die intensivste Färbung aller untersuchten Gewebe. Dabei waren sämtliche Tumorzellen mit einer starken Intensität angefärbt. Zusätzlich zur zytoplasmatischen Färbung ist auch eine Membranfärbung zu erkennen. Die mitgeführten Negativkontrollen zeigten keine Färbung (Abb. 19).

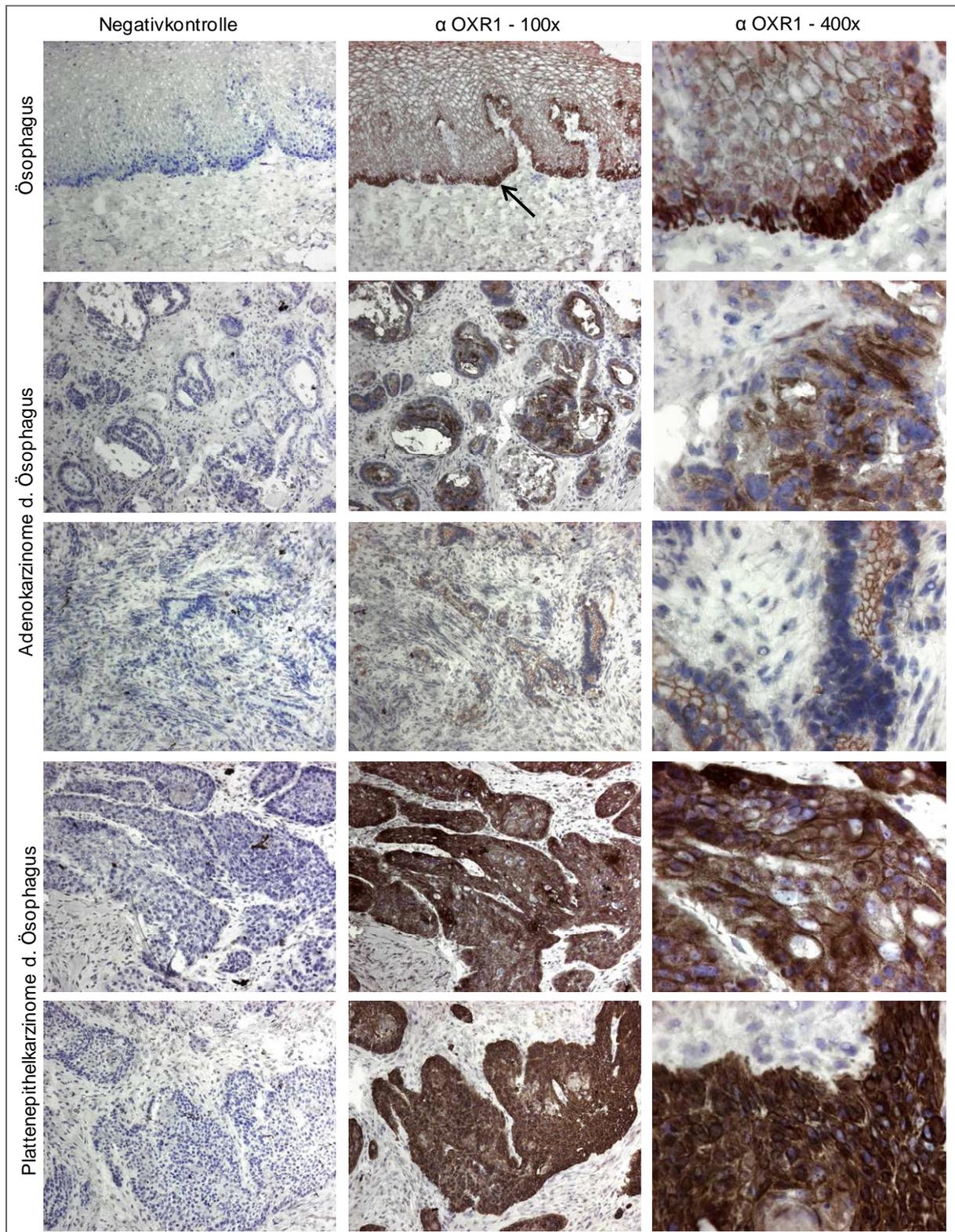


Abb. 19: Expression des OXR1 in humanen Ösophaguskarzinomen und im Normalgewebe des Ösophagus. Kryoschnitte wurden mit dem OXR1-Antikörper (Santa Cruz) gefärbt und mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Negativkontrollen wurden ohne OXR1-Antikörper inkubiert. α OXR1 Antikörper-Färbung. Die Bilder wurden mit dem Axiophot (Zeiss) aufgenommen.

In Tab. 5 sind alle analysierten Gewebe mit der Intensität der Färbung und Fallzahlen zusammengefasst. Der OXR1 konnte zusätzlich zu den oben gezeigten Geweben in Nieren, Nebennieren, Leber und Gehirn detektiert werden, wobei die Färbungen in diesen Präparaten diffuse Muster aufzeigten (nicht gezeigt). Zusätzlich wurde Normalgewebe der Milz und der Schilddrüse untersucht, welches keine OXR1-Färbung aufwies (nicht gezeigt). Die stärkste α OXR1-Färbung zeigten die Plattenepithelkarzinome des Ösophagus, gefolgt von den pankreatischen Adenokarzinomen und den kolorektalen Karzinomen. Aufgrund der intensiven Färbung und der hohen Frequenz der angefärbten Tumorzellen im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus richtete sich das weitere Interesse auf die Tumoren des Ösophagus.

Tab. 5: Übersicht der Expression des OXR1 in humanem Tumorgewebe und Normalgewebe.

- keine Färbung; + Färbung; ++ starke Färbung; +++ sehr starke Färbung

Tumor/Gewebe/Patient	Tumor		Normal	
	Signal	N=	Signal	N=
Ösophagus-Karzinom		30		
Plattenepithel-Karzinom	+++	14/15	+++	25
Adenokarzinom	+ & ++	13/15		
Magen-Karzinom	+	5/6	+	2
Pankreas-Adenokarzinom	++	6/7	++	2
Pankreas-NET	+ & ++	6/7	++	2
Ileum-NET	+	2/2	+	2
Kolorektales Karzinom	++	7/7	++	2

3.2.2 Expressionsmuster für die diagnostisch/therapeutische Anwendung

3.2.2.1 Semi-quantitative Auswertung der Histologischen Färbungen

Um eine verlässliche Aussage über das Verhältnis der Expression des OXR1 zwischen Tumor- und Normalgewebe im Ösophagus treffen zu können wurden je 15 Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und deren korrespondierendes Normalgewebe mittels der IHC-Methode gefärbt. Die Signalstärke der Färbungen und der Anteil an gefärbten Tumorzellen wurden von zwei Experimentatoren unabhängig ausgewertet und anschließend die Mittelwerte bestimmt.

Der semi-quantitative Vergleich der drei Gruppen (Abb. 20) spiegelte den schon in den Vorversuchen gezeigten Unterschied zwischen Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen wider.

Die Plattenepithelkarzinome des Ösophagus zeigten eine sehr starke Färbung; in den Adenokarzinomen war im Mittel nur eine moderate Färbung zu detektieren. Das Expressionsniveau des OXR1 in den Adenokarzinomen lag unter dem des Normalgewebes. Die Plattenepithelkarzinome zeigten im Mittel die gleiche Signalintensität wie das Normalgewebe. Betrachtet man die Signalintensitäten der Gewebeschnitte im Einzelnen, so zeigte sich, dass bei den Plattenepithelkarzinomen dreizehn von fünfzehn (86 %) Präparate als stark bis sehr stark gefärbt beurteilt wurden, hingegen nur 8 (53 %) von den Adenokarzinomen diese Einschätzung bekamen. Nur zwei (13 %) Präparate der Plattenepithelkarzinome wurden als gar nicht und wenig gefärbt beurteilt, bei den Adenokarzinomen waren es sieben (46 %).

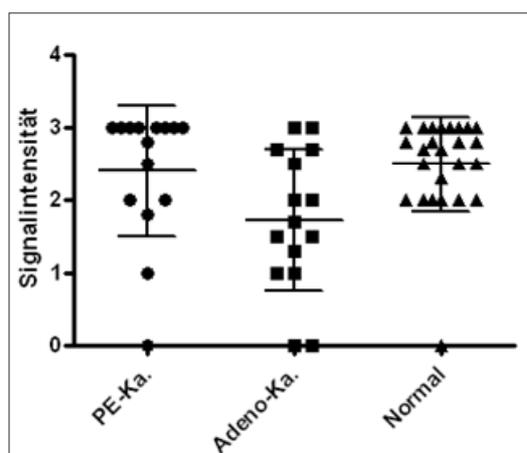


Abb. 20: Expression des OXR1 in humanen Ösophagus-Tumoren.

Kryoschnitte wurden mit dem OXR1-Antikörper (Santa Cruz) gefärbt und mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Beurteilung der Signalintensität. Angezeigt sind Mittelwerte \pm SD. Expression des OXR1 in humanen Ösophagus-Tumoren.

3.2.2.2 Patientengruppen-assoziierte OXR1-Verteilung

Um zu untersuchen, ob eine Patientengruppen-assoziierte Expressionsverteilung des OXR1 vorliegt, wurden die Signalstärken der gefärbten Tumore der Färbintensität ihres korrespondierenden Normalgewebes gegenüber gestellt, der Anteil an gefärbten Tumorzellen in Prozent ermittelt und alle Parameter auf die Klassifizierung der Tumoren bezogen (Tab. 6). Diese spezifischen Zusammenhänge sollten auf funktionelle Eigenschaften des Rezeptors in der Tumorphysiologie hinweisen.

Der Vergleich der Plattenepithelkarzinome (Tab. 6) zu ihrem korrespondierenden Normalgewebe zeigte, dass bei Tumoren mit sehr starker Färbung nahezu alle vorhandenen Tumorzellen der Plattenepithelkarzinome gefärbt waren (Tab. 6). Erst mit der Abnahme der Signalstärke der Färbung der Tumorzellen schwankte auch der Anteil an gefärbten Tumorzellen. Aus Tab. 6 wird deutlich, dass 70 % der Plattenepitheltumore eine höhere oder eine äquivalente Signalintensität aufwiesen im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe. Hingegen hatten 30 % der Tumore eine geringere Signalintensität im Vergleich zum Normalgewebe. Die Stichprobenmenge und teilweise unvollständige Klassifizierungsdaten erschwerten die Feststellung signifikanter Aussagen über den Zusammenhang zwischen der Klassifizierung und der OXR1-Expression. Deshalb konnten nur Tendenzen dargestellt werden. Tab. 6 führt auf, dass sowohl in der Gruppe mit höherer Signalstärke im Tumor als auch in der Gruppe mit geringerer Signalstärke im Tumor, Patienten mit und ohne

Lymphknotenbefall zu verzeichnen waren. Genauso verhielt es sich mit dem Grad der Differenzierung. In Geweben mit den Differenzierungsstadien G2 und G3 konnten hohe sowie mittlere Färbeintensitäten detektiert werden. Es scheint somit keinen Zusammenhang zwischen dem Befall von Lymphknoten, also einer Metastasierung, und der OXR1-Expression zu geben.

Der Vergleich der Adenokarzinome (Tab. 6) zu ihrem korrespondierenden Normalgewebe zeigte, dass die Signalstärke des Tumors in vier Patienten (44 %) stärker oder gleich der des korrespondierenden Normalgewebes war. Fünf Tumore (55 %) zeigten eine schwächere Färbung der Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe. Es fiel auf, dass alle Tumore, die stärker oder gleich stark gefärbt waren wie das Normalgewebe, einen Differenzierungsgrad (G) von Drei (schwach differenziert) aufwiesen und mindestens mit T3 beurteilt wurden. In dieser Gruppe gab es drei Patienten, deren Tumorzellen metastasiert waren, und einen Patienten, dessen Lymphknoten frei von Metastasen war. In der schwächer gefärbten Gruppe gab es ebenso Patienten mit und ohne Metastasen. Diese Gruppe zeigte auch Tumore, die mäßig bis schwach differenziert waren (Grad 2 und 3) und mit den Größenmaßen T2 bis T4 klassifiziert wurden.

Tab. 6: Übersicht der Signalstärke der α OXR1-IHC-Färbung.

Dargestellt ist die Signalstärke der Tumorzellen im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe in Patienten mit Ösophaguskarzinomen. - keine Färbung; + Färbung; ++ starke Färbung; +++ sehr starke Färbung

	Patient	Signalstärke der Tumorzellen	Anteil der gefärbten Tumorzellen in %	Signalstärke der Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe			Klassifikation
				stärker	gleich	schwächer	
PE-Ka.	#35	+++	100	X			T3/N0 - Stadium I B – II B
	#14	+++	90	X			T3 /N1/G3 – Stadium III A
	#10	+++	100	X			T3/N1/G2 - Stadium III A
	#3	+++	100	X			T3 /N0/G2 - Stadium II A/B
	#12	+++	95		X		T3/N1/G3 - Stadium III A
	#49	+++	100		X		T3
	#64	+++	100		X		T3 /N1/G2 - Stadium III A
	#9	+++	70		X		T1/N1/G2 - Stadium II B
	#17	+++	90		X		T3/N1/G2 - Stadium III A
	#38	++	90			X	T3/N1/G2 - Stadium III A
	#1	++	80			X	T2/N1/G2 - Stadium II B
	#22	+	70			X	T2/N0/G3 - Stadium II A/B
#32	-	-			X	T3/N1/G2-3 - Stadium III A	
Adeno-Ka.	#62	+++	90	X			T4/N2/G3 - Stadium III C
	#28	+++	80	X			T3/N1/G3 - Stadium III A
	#81	++/+++	80		X		T3/N0/G3 - Stadium II B
	#23	++/+++	60		X		T3/N1/G3 - Stadium III A
	#74	-	0			X	T3/N0/G3 - Stadium II B
	#30	-	0			X	-
	#24	+	20			X	T2b/N3/G3 - Stadium III C
	#68	+	60			X	T3/N1/G2 - Stadium III A
	#53	+/+++	90			X	T4/N1/G2/M1 - Stadium IV

3.2.3 Zelltypisierung der OXR1 exprimierenden Zellen im humanen Normalgewebe und Tumorgewebe des Ösophagus

Um zu zeigen, in welchen Zellen der OXR1 exprimiert ist, wurden sequenzielle Gewebeschnitte mit Antikörpern gegen Zytokeratin 19, Vimentin und OXR1 gefärbt und die Färbemuster verglichen. Das Intermediär Filament Zytokeratin 19 (CK19) ist ein Marker für Epithelzellen, wohingegen Vimentin ein Marker für das Bindegewebe (mesenchymale Zellen) ist.

In Abb. 21 ist zu sehen, dass CK19 stark im Plattenepithel des gesunden Ösophagus und sehr stark in den Zellen der Basalmembran exprimiert war. Der OXR1 zeigte ein ähnliches Färbemuster des Plattenepithels (Abb. 21, Mitte), wobei die Zellen der Basalmembran in der gezeigten Abbildung nicht gefärbt waren. Der Vimentin-Antikörper färbte sehr stark einzelne Bindegewebszellen des Normalgewebes (Abb. 21, Mitte). Alle mitgeführten Negativkontrollen, die nur mit den sekundären

Antikörpern inkubiert wurden, stellten sich als negativ dar (Abb. 21, obere Reihe). CK19 zeigte eine starke Expression in den Tumorzellen des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus (Abb. 21, untere Reihe). Der OXR1-Antikörper färbte genau die gleichen Tumorzellen. Es entstand somit ein identisches Färbemuster mit CK19 (Abb. 21, untere Reihe). Dagegen zeigte die Färbung mittels des Vimentin-Antikörpers, wie erwartet, eine moderate Färbung des Bindegewebes, in das die ungefärbten Tumorzellen eingestreut waren (Abb. 21, untere Reihe). Die negativen Kontrollen der Tumorgewebe waren alle ungefärbt (nicht gezeigt).

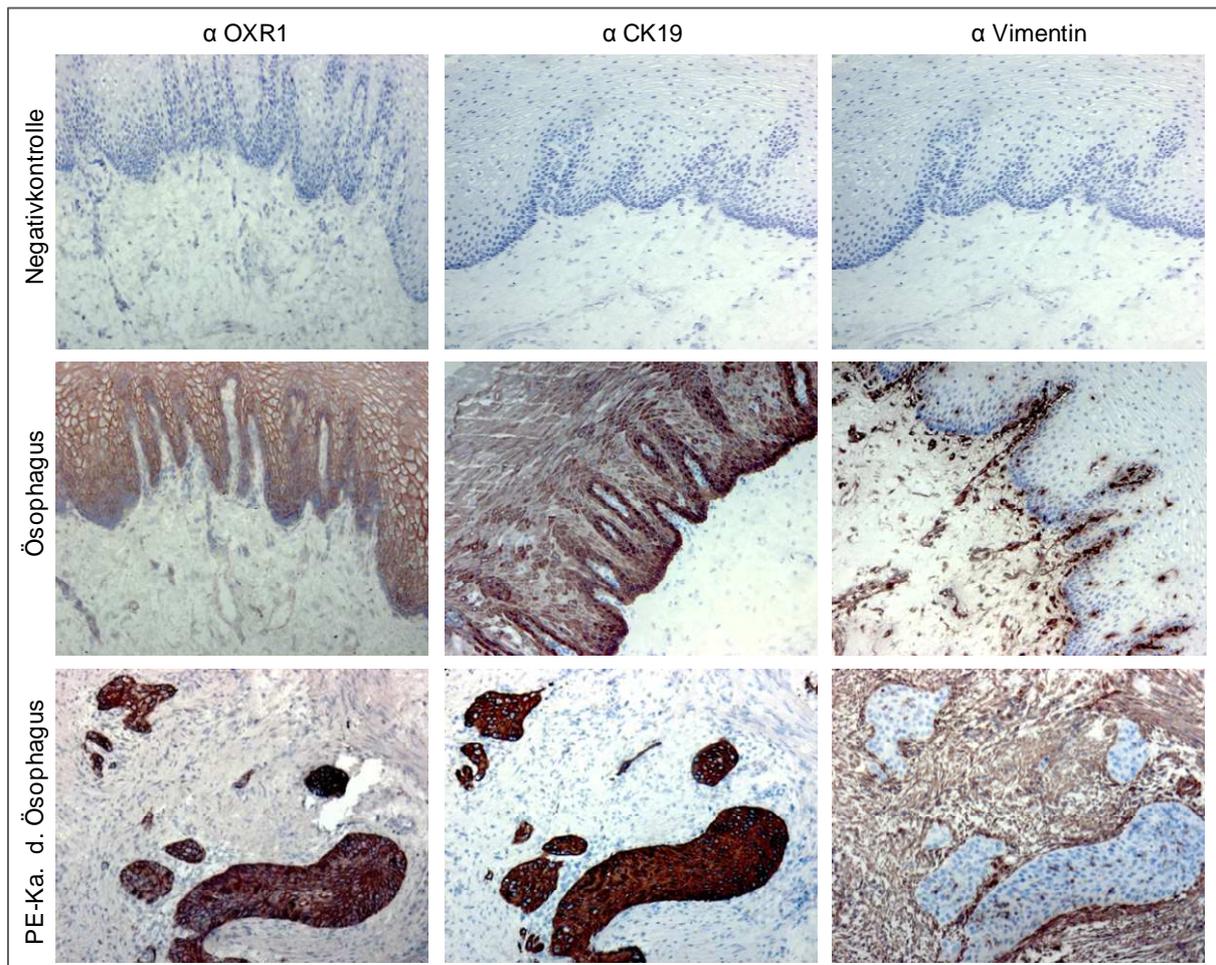


Abb. 21: Expression von OXR1, CK19, und Vimentin in humanem Normalgewebe und Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Serielle Kryoschnitte wurden mit dem OXR1-Antikörper (Santa Cruz), CK19 und Vimentin-Antikörpern gefärbt und mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Negativkontrollen wurden ohne primären Antikörper inkubiert. Die Bilder wurden mit dem Axiophot (Zeiss) mit einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen. Expression von OXR1, CK19, und Vimentin in humanem Normalgewebe und Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.

3.2.4 OXR in humanen gastrointestinalen Tumorzelllinien – RNA-Ebene

Zur weiteren Expressionsanalyse sollte zunächst auf RNA-Ebene geschaut werden, ob die Expression des OXR1 auch in humanen Tumorzelllinien gefunden werden konnte. Dies wäre ein weiterer Hinweis auf die Erhaltung der Zielstruktur nach Entartung in verschiedenen Tumorentitäten. Dazu wurde der OXR1 auf mRNA-Ebene mittels einer quantitativen Echtzeit-PCR (TaqMan) nachgewiesen. Aus verschiedenen humanen Tumorzelllinien wurde die RNA isoliert und die Qualität und Quantität der RNA mit einem Bioanalyser bestimmt.

Die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse (Abb. 22) zeigten unter den ösophagealen Zelllinien Kyse180, Kyse410, Kyse140 und OE33 eine Expression des Rezeptors. Die höchste Expression des Rezeptors war in der Kyse180-Tumorzelllinie zu verzeichnen. Im Fall der untersuchten pankreatischen Zelllinien erwiesen sich alle untersuchten als positiv. Bei den kolorektalen Tumorzelllinien konnte eine Expression des OXR1 in den Zellen CaCo2, HT-29, T84, SW480 und 620 und Colo205 und 320 nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Linien Colo320 und 205 nur eine geringe relative Expression. Die HCT116-, LS174T- und DLD1-Zelllinien waren negativ.

Da der Ligand OXA sowohl an den OXR1- als auch den OXR2-Rezeptor bindet, wurde zusätzlich die Expression des OXR2 auf RNA-Ebene mit untersucht. Es konnte nur in Zellen Kyse140, Kyse520 und BxPc3 eine Expression des OXR2 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Alle anderen Zelllinien zeigten keine Expression des OXR2.

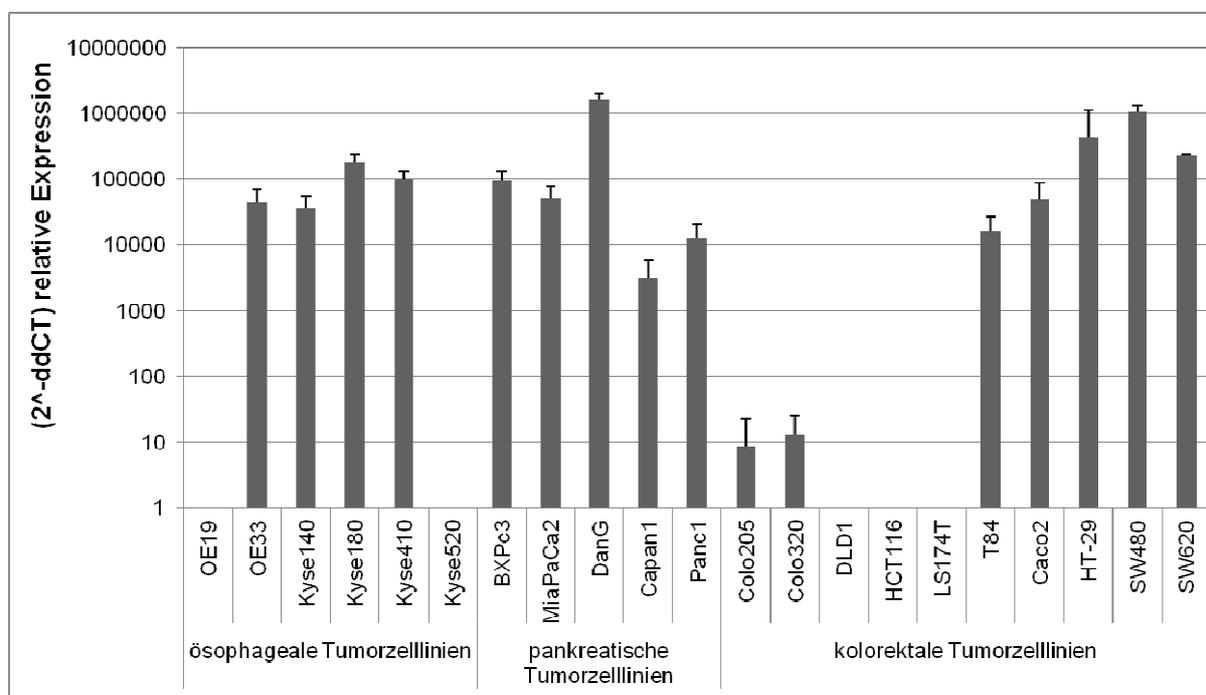


Abb. 22: Relative Expression des OXR1 in humanen Tumorzelllinien auf RNA-Ebene. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelt und grafisch dargestellt.

3.2.5 Zelluläre und Subzelluläre Lokalisation des OXR1 in humanen gastrointestinalen Tumorzelllinien

Die im vorherigen Kapitel gezeigte RNA-Expression sollte nun auf Proteinebene mittels einer IF auf den entsprechenden Tumorzelllinien weiter untersucht werden. Hier beschäftigte mich die Frage, ob die RNA auch in Protein translatiert wird und so die Zielstruktur in Form des Rezeptors auf Proteinebene vorhanden ist. Als Kontrollzelllinien wurden die Wildtyp Hek293a-Zellen als Negativkontrolle und der OXR1-Klon als Positivkontrolle mitgeführt. Außerdem wurde von jeder Zelllinie jeweils eine Negativkontrolle mitgefärbt, die nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurde.

Die Ergebnisse zeigten, dass der OXR1-Antikörper in den Zellen des OXR1-Klons deutlich die Zellmembranen anfärbte (Abb. 23). Dies entspricht dem üblichen Färbemuster für GPCRs als membranständige Rezeptoren. Die Hek293a-Wildtyp-Zellen, welche als negative Kontrollzelllinie diente, zeigten hingegen keine Färbung, genauso wie die Negativkontrollen, die ohne den α OXR1 behandelt wurden (Abb. 23, Kontrollzelllinien, Ko).

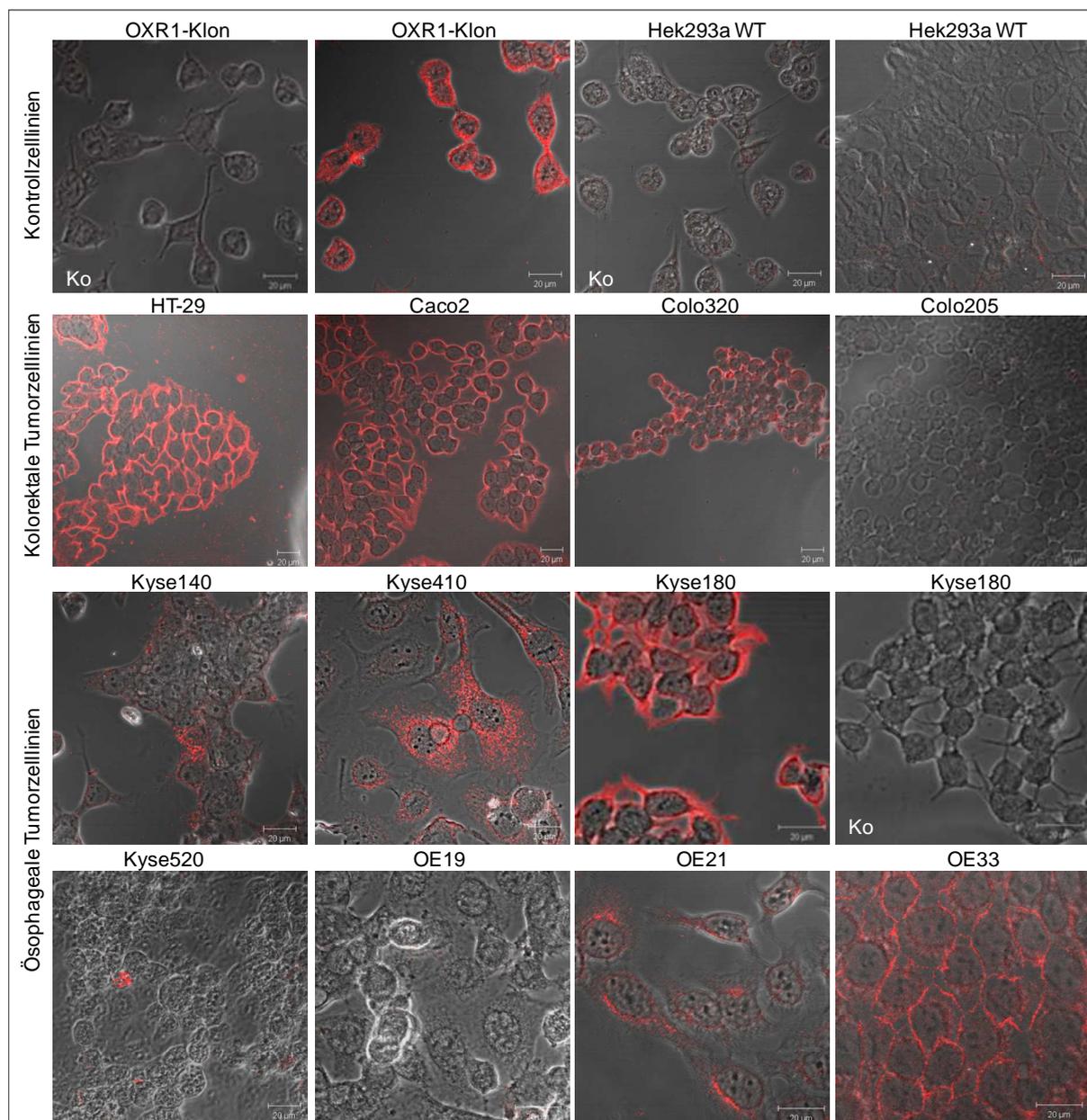


Abb. 23: Expression des OXR1 im OXR1-Klon, Hek293a-WT-Zellen, kolorektalen Tumorzelllinien und ösophagealen Tumorzelllinien. Zellen wurden fixiert und anschließend mit dem Antikörper gegen den OXR1 (Santa Cruz) inkubiert. Dieser wurde mittels Cy3-markierten Esel- α -Ziege-Antikörpers gefärbt (rot). Die Bilder wurden mit dem LSM mit einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen. Als Negativkontrollen (Ko) wurden die Zellen nur mit Puffer ohne OXR1-Antikörper inkubiert.

In Abb. 23 ist die Expression des OXR1 in verschiedenen kolorektalen Tumorzelllinien dargestellt. Es konnte in HT-29, CaCo2 und Colo320 eine Färbung mit dem OXR1-Antikörper detektiert werden. In allen Färbungen war eine Membranfluoreszenz zu sehen. Die Colo205-Zellen zeigten keine Färbung. Alle negativen Kontrollen waren nicht gefärbt.

In den ösophagealen Tumorzelllinien (Abb. 23) konnte eine geringe Färbung mit dem OXR1-Antikörper in Kyse140 und 410 erzielt werden. Die Kyse180-Zellen zeigten eine sehr intensive Immunfluoreszenzfärbung die membranständig konzentriert war. Hingegen wurde in den Kyse520-Zellen keine Färbung detektiert. In den Zelllinien OE21 und OE33 konnte der OXR1

ebenfalls mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 23). Die Immunfluoreszenzfärbung war teilweise membranständig konzentriert. In den OE19-Zellen wurde keine Färbung detektiert. Alle Negativkontrollen waren ungefärbt exemplarisch gezeigt an den Kyse180-Zellen.

Tab. 7 fasst die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR und der Immunfluoreszenz nochmals zusammen. Die quantitative Echtzeit-PCR erfasste die OXR1-Expression auf RNA-Ebene, wobei die Immunfluoreszenzen das Vorhandensein des Rezeptors auf Proteinebene zeigten. In Tab. 7 ist gut zu erkennen, dass beide Methoden in den jeweiligen Zelllinien zu ähnlichen Ergebnissen führten. War die RNA des Rezeptors vorhanden, so war auch das Protein mittels Immunfluoreszenz detektierbar. Eine Ausnahme stellten die Colo205-Zellen dar. Es wurde eine geringe Kopienzahl des OXR1-Transkripts mittels der quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse aber keine OXR1-Proteinexpression mit der IF in den Colo205-Zellen gezeigt. In Tab. 7 wurde davon abgesehen, die Signalintensitäten der Ergebnisse der jeweiligen Methoden aufzuzeigen und zu vergleichen.

Tumorentität	Zelllinie	IF	Taqman
Ösophageales Adenokarzinom	OE19	-	-
	OE33	+	+
Ösophageales Plattenepithelkarzinom	OE21	+	nd
	Kyse140	+	+
	Kyse180	+	+
	Kyse410	+	+
	Kyse520	-	-
Kolorektales Karzinom	HT-29	+	+
	Caco2	+	+
	Colo205	-	+
	Colo320	+	+

Tab. 7: Übersicht der Expression des OXR1 in humanen Tumorzelllinien.
 - OXR1 nicht detektiert; + OXR1 detektiert; nd: nicht durchgeführt

3.2.6 Detektion des OXR1 im Mausmodell

3.2.6.1 Erhaltung der Expression im subkutanen Tumormodell

Die endogene Expression verschiedener Tumorzelllinien sollte genutzt werden, um eine Peptid-Rezeptor-Bindung im Mausmodell zu untersuchen und so den OXR1 als Zielstruktur für eine gerichtete Tumorthherapie bzw. -diagnostik weiter zu charakterisieren. Dazu musste als erstes geklärt werden, ob die Zielstruktur im Tumormodell erhalten bleibt und somit frei zugänglich ist für ihre Liganden. Hierzu wurden zunächst Tumorzellen verschiedener Entitäten subkutan in Nacktmäuse injiziert. Nach einigen Wochen wurden die Tumore entnommen und Kryogewebeschnitte angefertigt, die dann mittels der IHC-Methode mit dem OXR1-Antikörper gefärbt wurden. Um den Erfolg der Färbung zu kontrollieren wurde immer ein Gewebeschnitt einer humanen Tonsille mit gefärbt (nicht gezeigt). Abb. 24 zeigt exemplarisch für jede untersuchte Tumorentität die IHC-Färbung jeweils eines subkutanen Tumors. Die Negativkontrollen waren ungefärbt hier exemplarisch am Kyse410-Tumor zu sehen bzw. wiesen eine leichte Hintergrundfärbung auf, exemplarisch am Kyse180-Tumor zu sehen (Abb. 24, Ko). Der subkutane Kyse180-Tumor wies eine starke, meist membranständige Färbung der Tumorzellen auf. Jedoch war in der Negativkontrolle eine leichte Hintergrundfärbung zu sehen. Der Kyse410-Tumor zeigte ebenfalls eine deutliche Färbung, die jedoch nicht so intensiv ausfiel verglichen mit dem Kyse180-Tumor.

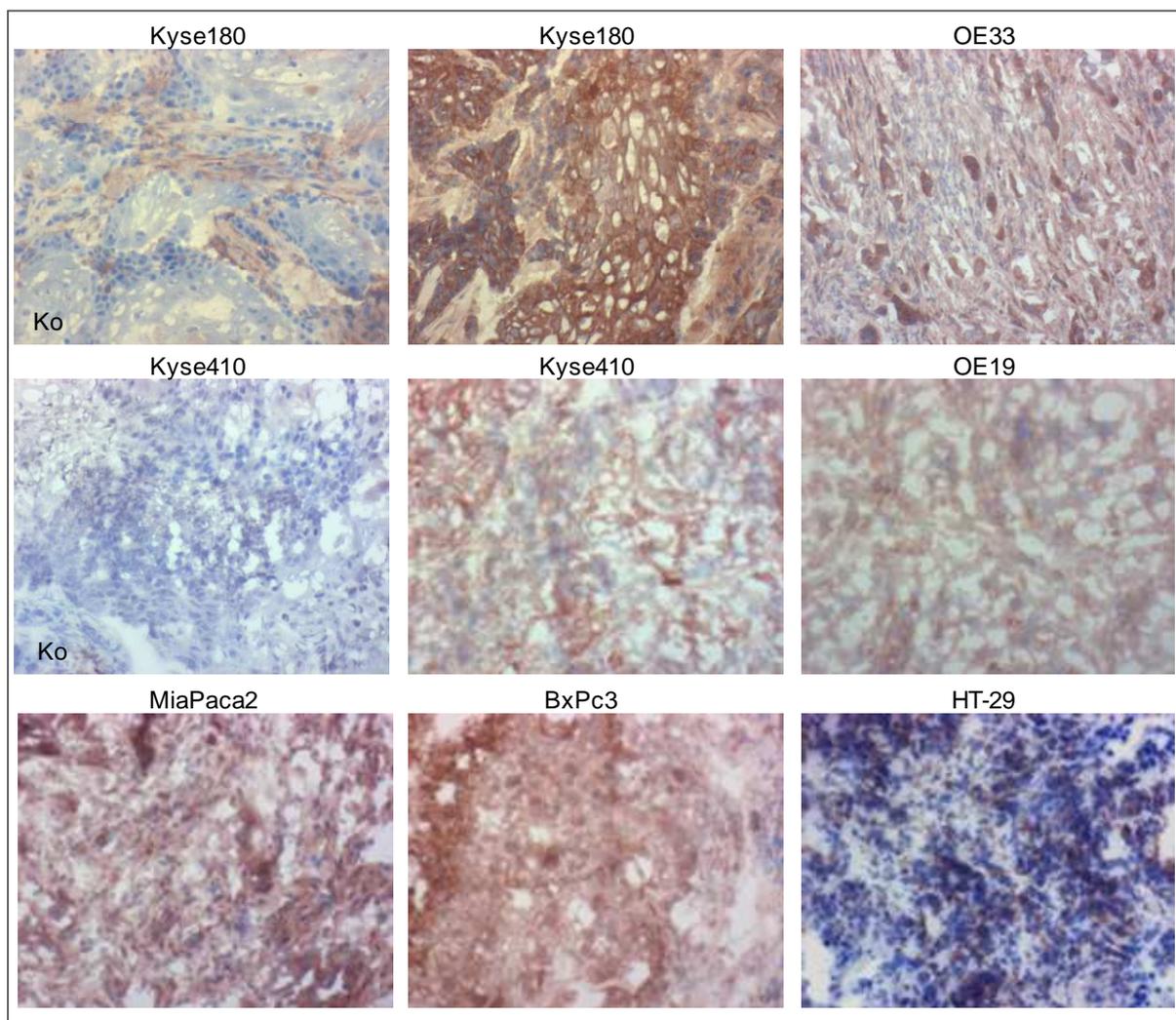


Abb. 24: Expression des OXR1 in subkutanen Tumoren. Kryoschnitte der entnommenen Tumore wurden mit dem OXR1-Antikörper (Santa Cruz) gefärbt und mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die Bilder wurden mit dem Axiophot (Zeiss) mit einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Negativkontrollen (Ko) wurden ohne den primären AK inkubiert.

Die Färbung eines OE19-Tumors (Abb. 24) mit dem OXR1-Antikörper wirkte unspezifisch und diffus. Der OE33-Tumor (Abb. 24) zeigte eine starke zytoplasmatische Färbung einzelner Tumorzellen sowie eine leichte Färbung der extrazellulären Matrix. Die Negativkontrolle wies keine Färbung auf.

Die Abb. 24 zeigt außerdem einen Tumor generiert mittels MiaPaca2-Zellen, BxPc3- und HT-29-Zellen. Der MiaPaca2-Tumor zeigte ähnlich wie die OE33-Tumore teilweise stark zytoplasmatisch gefärbte einzelne Zellen. Hingegen, war bei dem BxPc3-Tumor teilweise eine Färbung der Membranen einzelner Tumorzellen zu sehen. Es zeigten jedoch beide Präparate eine diffuse unspezifische Hintergrundfärbung, obwohl die negativen Kontrollen nicht gefärbt waren. Die HT-29-Zellen des subkutanen Tumors waren sehr fein aber kräftig gefärbt. Auch die HT-29-Zellen des subkutanen Tumors zeigten keine Färbung der Negativkontrolle.

3.2.6.2 NIR-Detektion der OXR1-Expression im subkutanen Tumormodell

Abschließend sollte die Bindung des fluoreszenzmarkierten OXA in subkutanen und orthotopen Tumormodellen unterschiedlicher Entitäten untersucht werden. Diese Versuche sollten Aufschluss darüber geben, ob die Verwendung des OXR1 als Zielstruktur für eine gerichtete Diagnostik und Therapie geeignet ist. Hierzu wurden Kyse180-, HT-29- und MiaPaca2-Zellen subkutan in beide Flanken der Nacktmäuse inokuliert bzw. wurden im Fall der kolorektalen Tumorzelllinie HT-29 auch drei orthotope Tumormodelle untersucht. Nach unterschiedlichen Wachstumszeiten (deutliche Tumorbildung) wurden den Tieren das OXA-IDCC intravenös verabreicht und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Fluoreszenzintensitäten mittels der NIRF-Bildgebung gemessen.

Nach OXA-IDCC-Injektion wurde die Fluoreszenzintensität nach 10 min, 30 min, 1 h, 2 h und 20 h gemessen.

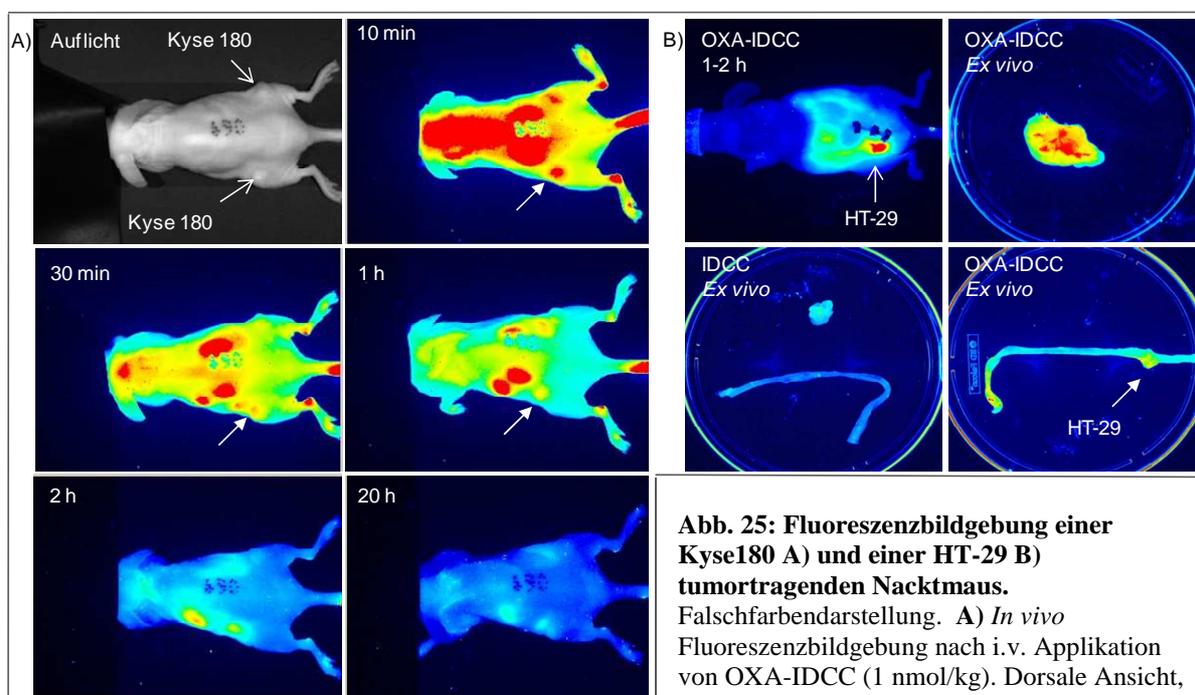


Abb. 25: Fluoreszenzbildgebung einer Kyse180 A) und einer HT-29 B) tumortragenden Nacktmaus. Falschfarbendarstellung. **A)** *In vivo* Fluoreszenzbildgebung nach i.v. Applikation von OXA-IDCC (1 nmol/kg). Dorsale Ansicht, **B)** *In vivo* und *Ex vivo* Fluoreszenzbildgebung

nach i.v. Applikation von OXA-IDCC (1 nmol/kg) bzw. IDCC. Ventrale Ansicht, Tumore sind mit Pfeilen angedeutet. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Petra Schulz und Cordula Dierkes.

Es zeigte sich bei diesen Experimenten nur jeweils ein mit Kyse180- und HT-29-Tumorzellen induzierter Tumor positiv (Abb. 25). Die stärkste Fluoreszenz-Anreicherung im Kyse180-Tumor (Pfeil) wurde 10 min nach Injektion detektiert, danach nahm die Fluoreszenz in den Tumoren stetig ab. Nach 2 h war die gemessene Fluoreszenz über das Tier verteilt und stark zurückgegangen. Der mit HT-29 Zellen generierte orthotope Tumor zeigte *in vivo* nach 1-2 h post Injektion von OXA-IDCC eine starke Konzentration des OXA-IDCC im Tumor, wobei der restliche Körper keine Anreicherung des OXA-IDCC zeigte. Die oben rechts in Abb. 25 B zu erkennbare, Peritoneal-Metastase konnte *ex vivo* mittels der Fluoreszenz detektiert werden. Genauso zeigte der Tumor im Darm *ex vivo* eine

OXA-IDCC-Anreicherung (Abb. 25 B unten rechts) im Vergleich zur Kontrolle mit freiem Farbstoff IDCC (Abb. 25 B unten links).

Eine Zusammenfassung über alle untersuchten Tumore und deren Signal in der Fluoreszenzbildgebung nach Applikation des fluoreszenzmarkierten OXA ist in Tab. 8 zusammengefasst. Insgesamt wurden zehn Nacktmäuse in der NIR-Fluoreszenzbildgebung nach OXA-IDCC-Injektion untersucht. Hiervon zeigten sich zwei positiv (Abb. 25). Ein Kyse180-Tumor und ein HT-29-Tumor konnten mittels der NIR-Fluoreszenzbildgebung innerhalb der ersten zwei Stunden nach OXA-IDCC Applikation detektiert werden. Keiner der zwei MiaPaca2-Tumoren wurde mit der NIR-Bildgebung detektiert (Tab. 8).

Maus	Tumor	Lokalisation	Signal <i>in vivo</i>	Signal <i>ex vivo</i>
#490	Kyse180	subkutan	+	nd
#496	Kyse180	subkutan	-	nd
#498	Kyse180	subkutan	-	nd
#492	HT-29	subkutan	-	nd
#493	HT-29	subkutan	-	nd
#550	HT-29	orthotop	-	-
#554	HT-29	orthotop	-	-
#540	HT-29	orthotop	+	+
#527	MiaPaca2	subkutan	-	nd
#529	MiaPaca2	subkutan	-	nd

Tab. 8: Übersicht der Fluoreszenzbildgebung mit OXA-IDCC

3.3 Funktion des OXR1

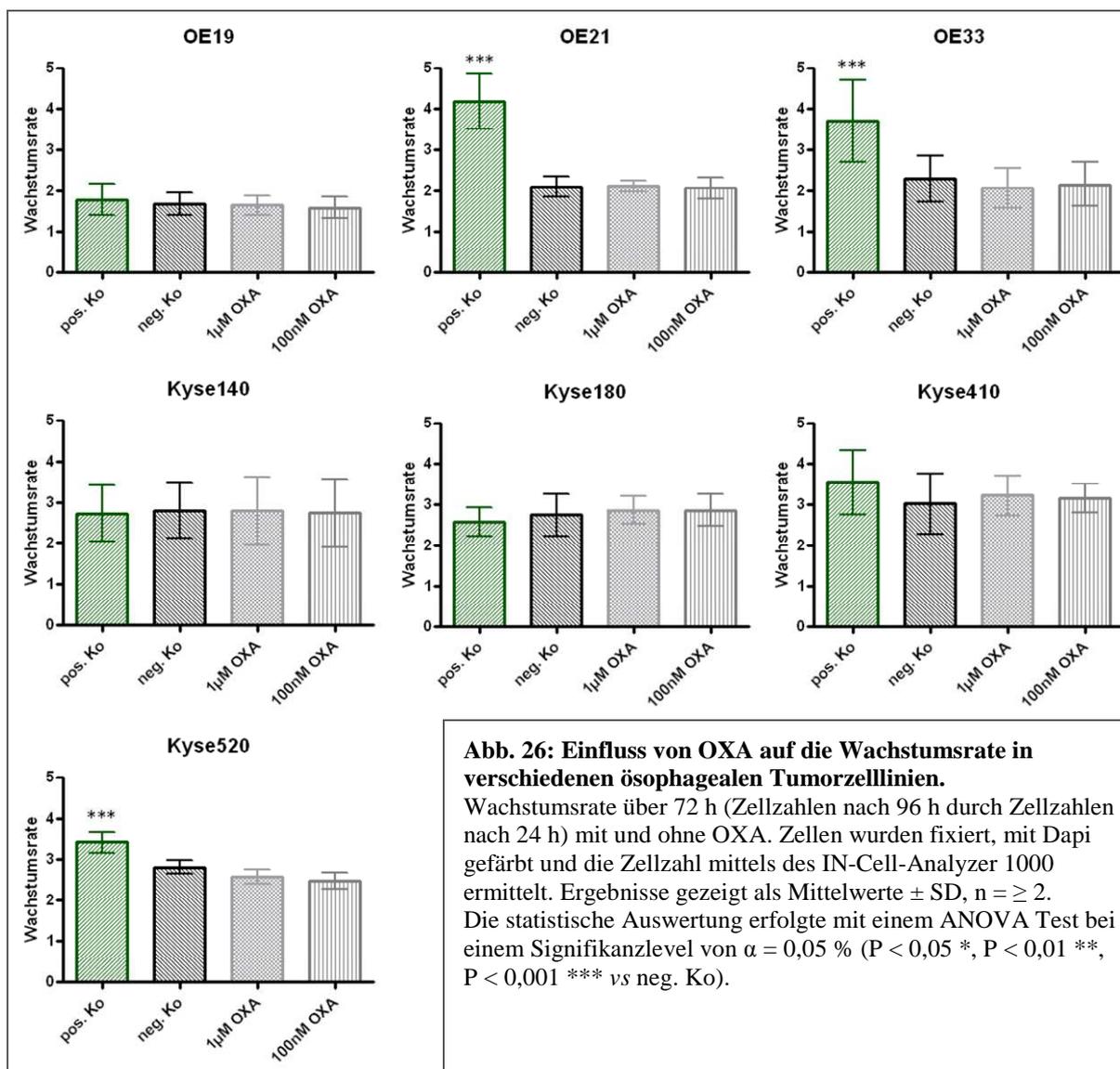
Im folgenden Abschnitt der Arbeit wurde die Funktion des OXR1 auf zelluläre Effekte in verschiedenen Tumorzelllinien untersucht. Dazu wurden humane Tumorzelllinien verschiedener Entitäten nach Inkubation mit dem OXR1-Liganden OXA untersucht. Bei diesen Untersuchungen stand die Frage nach den OXA induzierten Effekten in den Tumorzellen im Mittelpunkt, welche auf eine Funktion des Rezeptors in den Tumorzellen schließen lassen würde. In der Literatur sind unterschiedliche Effekte von OXA beschrieben, wobei die meisten Untersuchungen hierzu in rekombinanten Systemen durchgeführt wurden. Im Folgenden sollten vor allem die endogenen Funktionen untersucht und mit einem Überexpressionssystem verglichen werden.

3.3.1 Zelluläre Liganden-Effekte

3.3.1.1 Einfluss von OX auf die Proliferation und Apoptose in humanen Tumorzelllinien

Zunächst war der funktionelle Einfluss von OXA auf die Proliferation und die Apoptose zu klären. Hierzu wurden die ösophagealen Tumorzelllinien für 24 h bzw. 96 h mit OXA inkubiert, um anschließend die Wachstumsrate über 72 h zu ermitteln. Als Positivkontrolle diente hier Kompletmedium (10 % FCS), als Negativkontrolle diente Minimalmedium (0,5 % FCS). Die unterschiedlichen Konzentrationen an OXA wurden in Minimalmedium (0,5 % FCS) auf die Zellen gegeben. Die Positivkontrolle sollte den Erfolg des Experiments kontrollieren. Sollte OXA proliferationsfördernd wirken, war ein signifikanter Anstieg der Wachstumsrate im Vergleich zur Negativkontrolle zu erwarten.

In Abb. 26 ist der Einfluss von OXA auf das Zellwachstum innerhalb von 72 h in verschiedenen ösophagealen Tumorzelllinien zu sehen. Es ist auffällig, dass nur in den OE21-Zellen, OE33-Zellen und Kyse520-Zellen eine signifikant höhere Wachstumsrate in der Positivkontrolle mit 10 % FCS erzielt werden konnte. Alle anderen untersuchten Zelllinien zeigten keine Beeinflussung des Zellwachstums durch die Verminderung des FCS-Anteils im Medium. Die Abbildung zeigt, dass in keiner untersuchten Zelllinie eine OXA vermittelte Veränderung der Wachstumsrate festgestellt werden konnte.



Der Einfluss von OXA auf die HT-29-Zellen wurde aufgrund des bestehenden Publikationshintergrundes etwas eingehender untersucht. Bei diesen Experimenten wurde eine zusätzliche Apoptosekontrolle mitgeführt, um sicherzustellen, dass die Darstellung apoptotischer Zellen mit dem Methodenspektrum erfolgreich war. Die Apoptoseinduktion erfolgte hier mittels des Tumornekrosefaktors α (TNF α) und Cycloheximid (CHx).

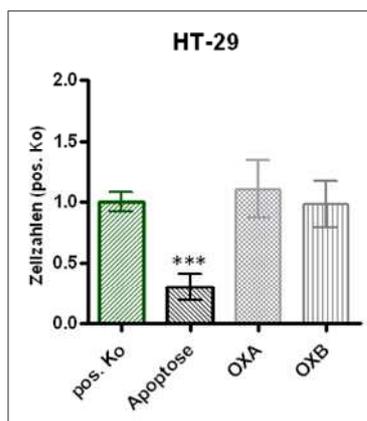


Abb. 27: Einfluss von OXA und OXB auf die Zellzahlen in HT-29.

Zellen wurden über 48 h mit Komplettmedium (pos. Ko) mit und ohne OXA, OXB und TNF α + CHx (Apoptose) behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert, mit Dapi gefärbt und Zellzahlen mittels des IN-Cell-Analyzer 1000 ermittelt. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Statistische Auswertung erfolgte mit einem ANOVA Test bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ % (P < 0,05 *, P < 0,01 **, P < 0,001 *** vs pos. Ko).

Die Abb. 27 zeigt die Zellzahlen bezogen auf die Positivkontrolle (Komplettmedium) nach 48 h Wachstum mit und ohne OXA und B bzw. Apoptosstimulatoren. Es ist eine signifikante Erniedrigung der Zellzahlen nach 48 h mit TNF α und CHx zu beobachten gewesen, hingegen konnte mittels Inkubation von OXA und OXB kein Effekt auf die Zellzahlen gezeigt werden. Um diese Beobachtung, die der Literatur entgegensteht, weiter zu unterstützen, wurde der Effekt von OXA und OXB auf die HT-29-Zellen mittels einer weiteren Methode untersucht. Der stabil transfizierte OXR1-Klon und die HT-29-Zellen wurden über 48 h mit und ohne OXA, OXB und den Apoptosinduktoren inkubiert, fixiert und mittels einer Färbung mit Propidiumiodid (PI) im Durchflusszytometer auf den Zellzyklus und die Apoptose hin untersucht. Die apoptotischen Zellen besitzen, wegen der mit der Apoptose einhergehenden DNA-Fragmentierung, weniger DNA als den einfachen Chromosomensatz (G1-Phase) (2.2.3.2.).

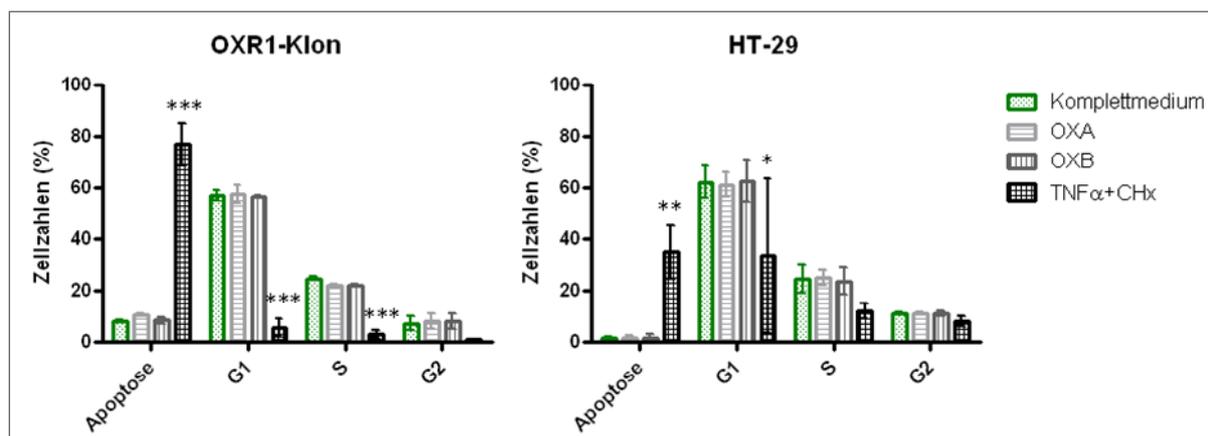


Abb. 28: Einfluss von OX auf den Zellzyklus und die Apoptose in HT-29-Zellen und dem OXR1-Klon.

Zellen wurden über 48 h mit Komplettmedium mit und ohne OXA, OXB und TNF α + CHx behandelt. Nach Fixierung wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. TNF α + CHx zeigen eine Apoptoseinduktion, wohingegen die OX keinen Einfluss auf die Apoptose und den Zellzyklus haben. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ANOVA Test bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ % (P < 0,05 *, P < 0,01 **, P < 0,001 *** vs Kontrolle (grün)).

In beiden Zelllinien ist ein signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen mit TNF α und CHx zu erkennen gewesen im Vergleich zur Kontrolle (Komplettmedium (grün)) (Abb. 28). Im Zuge dieser Apoptoseinduktion war eine signifikante Abnahme der Zellen in der G1-Phase und im Falle des

stabilen OXR1-Klons auch in der S-Phase zu detektieren. Die HT-29 waren unempfindlicher gegenüber der Apoptosestimulation mit TNF α und CHx als der stabile OXR1-Klon. Die HT-29-Zellen zeigten im Mittel nur 35 % apoptotische Zellen, wohingegen in 77 % der Zellen des stabilen OXR1-Klons Apoptose induziert wurde (Anhang Tab. 12). Die mit OXA und OXB behandelten Zellen zeigten in beiden untersuchten Zelllinien keine Zu- oder Abnahme an apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Komplettmedium (grün)) (Abb. 28 und Anhang Tab. 12). Genauso sind keine nennenswerten Unterschiede der prozentualen Zellzahlen in Bezug auf die Kontrolle (grün) in den Zellzyklusphasen zu verzeichnen gewesen (Abb. 28 und Anhang Tab. 12). Es sind in beiden Zelllinien ca. 60 % der Zellen in der G1-Phase, 24 % in der S-Phase und um die 10 % in der G2-Phase (Anhang Tab. 12). In beiden untersuchten Zelllinien konnte keine OXA bzw. OXB induzierte Apoptose ermittelt werden. Weiter konnte auch kein Einfluss beider Peptide auf den Zellzyklus der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden.

3.3.2 OXR1-vermittelte Signaltransduktion

Es konnten in keiner der untersuchten Zelllinien signifikante Effekte von OXA und OXB auf die Proliferation und Apoptose gezeigt werden. Obwohl es nach Literaturangaben solche geben sollte und im ersten Teil meiner Arbeit das Vorhandensein des Rezeptors auf Proteinebene bestätigt und mit RNA-Daten verifiziert werden konnte. Diese Fakten führten unweigerlich zu der Frage der OXR1-vermittelten Signaltransduktion. Um die vermittelte Signaltransduktion und somit die Funktionalität des OXR1 zu zeigen, wurde zunächst die Kopplung des Rezeptors an unterschiedliche G-Proteine untersucht.

3.3.2.1 G-Protein-Kopplung des OXR1 in humanen Tumorzelllinien

Der OXR1 koppelt hauptsächlich über das G α_q -Protein direkt an den IP $_3$ -Signaltransduktionsweg. Die Kopplung eines Rezeptors über G α_q -Proteine löst in der Zelle eine Signaltransduktion aus, die eine Ca $^{2+}$ -Mobilisierung über IP $_3$ verursacht. Diese Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ist mittels eines kalziumsensitiven Farbstoffes zu messen. Es sind jedoch auch G α_s - und G α_i -Kopplung des Rezeptors bekannt. Die Kopplung an G α_s - und G α_i -Proteine löst über eine Signalkaskade eine Erhöhung (G α_s) bzw. eine Erniedrigung (G α_i) der intrazellulären cAMP-Konzentration aus.

Ca²⁺-Mobilisierung - Gα_q

Zunächst wurde der OXR1-Klon im Vergleich zu den Wildtyp Hek293a-Zellen auf den Anstieg an intrazellulärem Kalzium getestet und eine Konzentrationswirkungskurve erstellt, mittels der die halbmaximale Wirkkonzentration (EC₅₀-Werte) bestimmt werden konnte.

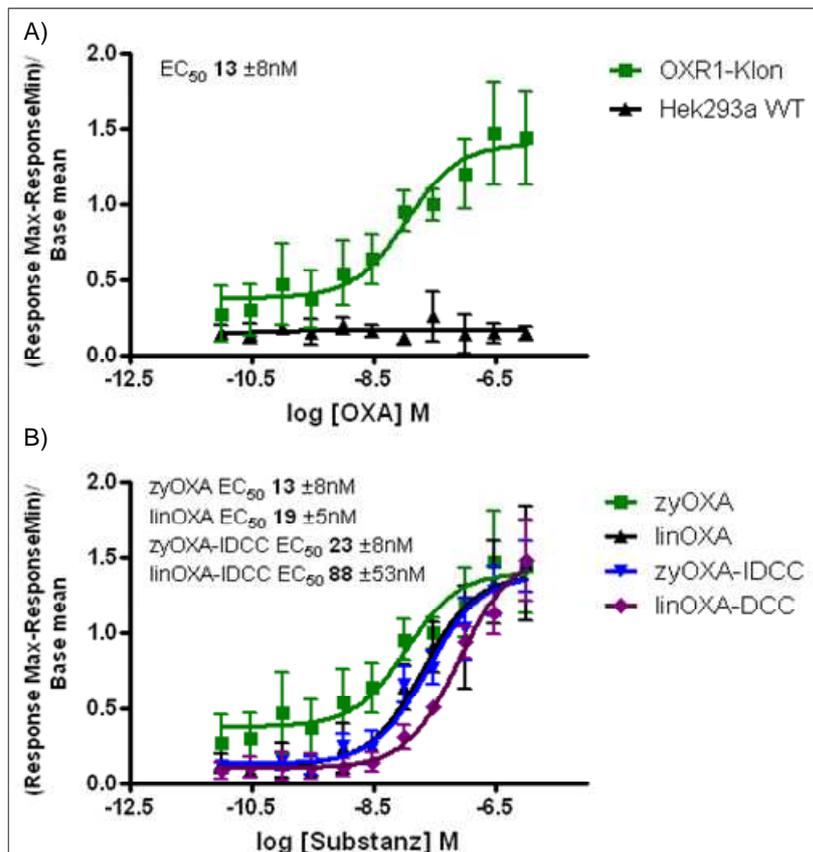


Abb. 29: Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Ca²⁺-Mobilisierung nach Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen von OXA.

A) Ca²⁺-Mobilisierung nach Stimulation des stabilen OXR1-Klons und der Hek293a WT Zelllinie mit zyOXA. Der OXR1-Klon zeigt eine konzentrationsabhängige Ca²⁺-Mobilisierung mit einer EC₅₀ von 13 nM im Vergleich zur Hek293a WT Zelllinie.

B) Ca²⁺-Mobilisierung nach Stimulation mit linearem (lin) und zyklischem (zy) OXA ohne und mit IDCC im stabilen OXR1-Klon. Die funktionelle Aktivität der verschiedenen Varianten des OXA ist vergleichbar. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte ± SD n = 3 (je Duplikate).

Die Abb. 29 A zeigt Konzentrationswirkungskurven des stabil transfizierten OXR1-Klons und der Ursprungs-Wildtyp-Zelllinie Hek293a. Das zyklische OXA zeigte im Klon eine halbmaximale Wirkung bei ca. 13 nM. Die Wildtyp-Zellen Hek293a zeigten keinen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels nach OXA-Applikation.

Es wurde außerdem untersucht, ob das native zyklische OXA mit zwei Disulfidbrücken (zyOXA) oder das reduzierte lineare OXA (linOXA) eine stärkere funktionelle Aktivität zeigt. Zunächst wurde die Aktivierung der Ca²⁺-Mobilisierung des linOXA mit dem zyOXA im OXR1-Klon verglichen (Abb. 29 B). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die zyklische Variante des OXA einen etwas stärkeren Effekt auf die Ca²⁺-Mobilisierung ausübte als die lineare Variante. Die halbmaximale Wirkungsdosis des linOXA lag bei ca. 19 nM im Vergleich zur oben erwähnten EC₅₀ des zyOXA von 13 nM. Da auch mit der fluoreszenzmarkierten Variante des Peptids gearbeitet werden sollte, musste die Frage geklärt werden, ob die Markierung mit dem Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff IDCC die Aktivität der Peptide beeinflusst. In Abb. 29 B sind dazu im Vergleich die Versuche mit der fluoreszenzmarkierten Varianten zu sehen. Es konnten EC₅₀-Werte von 23 nM für das zyOXA-IDCC und 88 nM für das linOXA-IDCC im stabilen OXR1-Klon ermittelt werden. Das zyklische OXA

zeigte demnach nur geringe Aktivitätseinbußen im Gegensatz zum linOXA. Für alle folgenden Versuche wurde aufgrund dieser Ergebnisse das zyOXA verwendet.

Nachdem der OXR1-Klon eine $G\alpha_q$ -Kopplung zeigte, die mittels der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung nachgewiesen werden konnte, wurden die ösophagealen Tumorzelllinien sowie der stabile OXR1-Klon auf eine Ca^{2+} -Mobilisierung nach OXA-Applikation untersucht. Es wurde jeweils eine Positivkontrolle (grün) mitgeführt, die aus einer Mixtur verschiedener Peptide bestand, sowie eine Negativkontrolle (schwarz), welche aus einer Pufferlösung ohne Peptide bestand. Die detektierte und anschließend normierte intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung wurde jeweils auf die Positivkontrolle (grün) bezogen (2.2.3.3.).

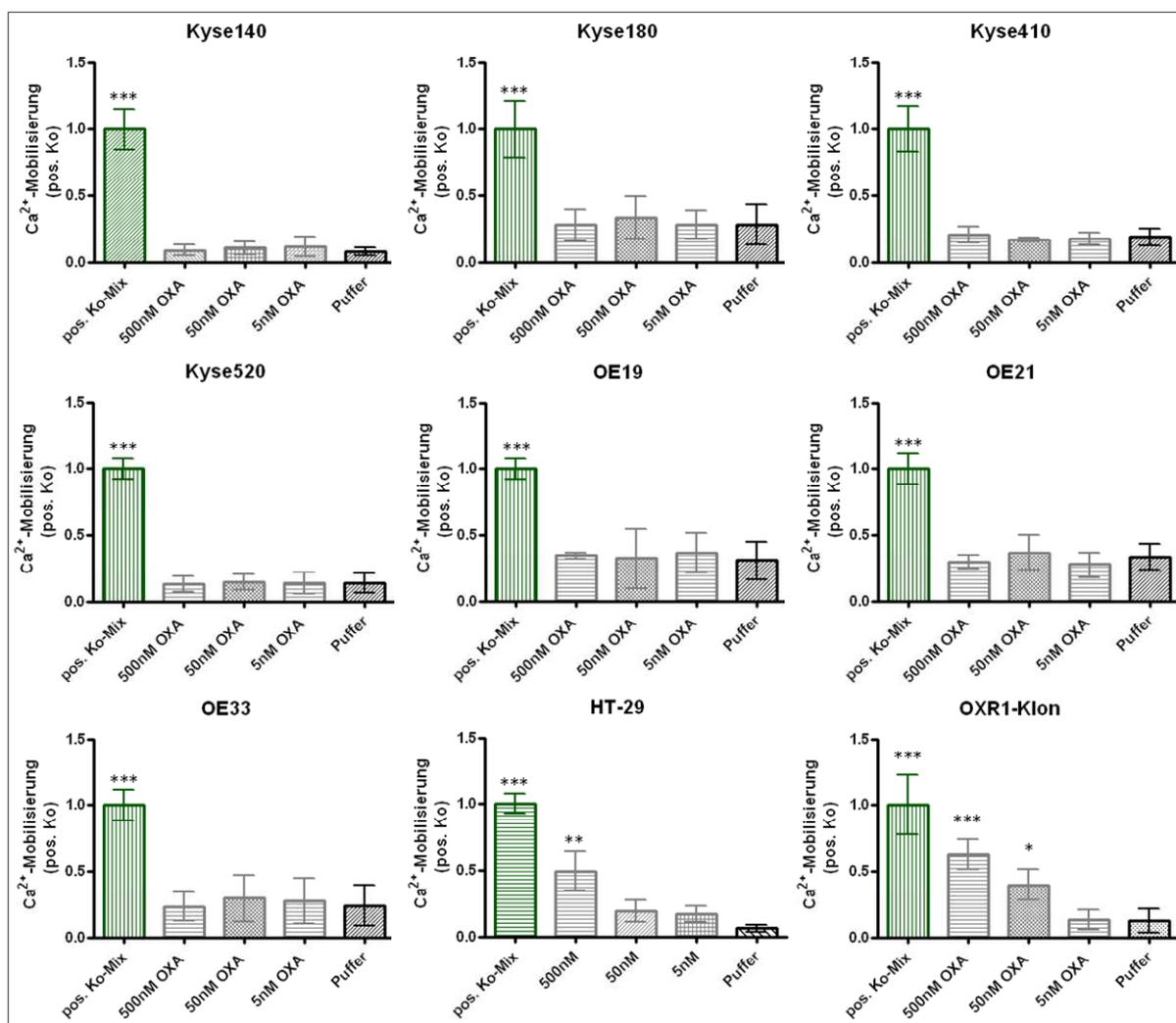


Abb. 30: Ca^{2+} -Mobilisierung nach OXA-Applikation. Die ösophagealen Zelllinien zeigten im Gegensatz zu dem stabilen OXR1-Klon und den HT-29-Zellen keine Ca^{2+} -Mobilisierung nach OXA-Applikation. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte \pm SD n = 2 (je Duplikate). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ANOVA Test bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ % ($P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ *** vs Puffer (schwarz)).

Die statistische Auswertung zeigte eine signifikante Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels nach Gabe der Positivkontrolle (grün) aller Zelllinien. Nach OXA-Gabe (grau) kam es lediglich in den Zellen des OXR1-Klons und in den HT-29-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der

Ca²⁺-Mobilisierung. Damit waren die kolorektalen HT-29-Tumorzellen die einzige native Zelllinie, die einen Kalziumanstieg im Zytosol nach OXA-Induktion zeigte. Dieser Anstieg war jedoch nur bei hohen OXA-Konzentrationen wie 500 nM zu erfassen.

Regulation der zellulären cAMP-Konzentration - G_s

Im Folgenden wurde eine mögliche G_s-Kopplung in allen ösophagealen Tumorzelllinien, dem stabilen OXR1-Klon und den HT-29-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zelllinien für 30 min mit verschiedenen OXA-Konzentrationen (grau), 10 µM Forskolin als Positivkontrolle (grün) und Pufferlösung als Negativkontrolle (schwarz) behandelt. Anschließend wurde die cAMP-Produktion in Prozent bezogen auf die Positivkontrolle Forskolin (grün) bestimmt. Forskolin aktiviert direkt die Adenylzyklasen, was unmittelbar zur Erhöhung des intrazellulären cAMP führt.

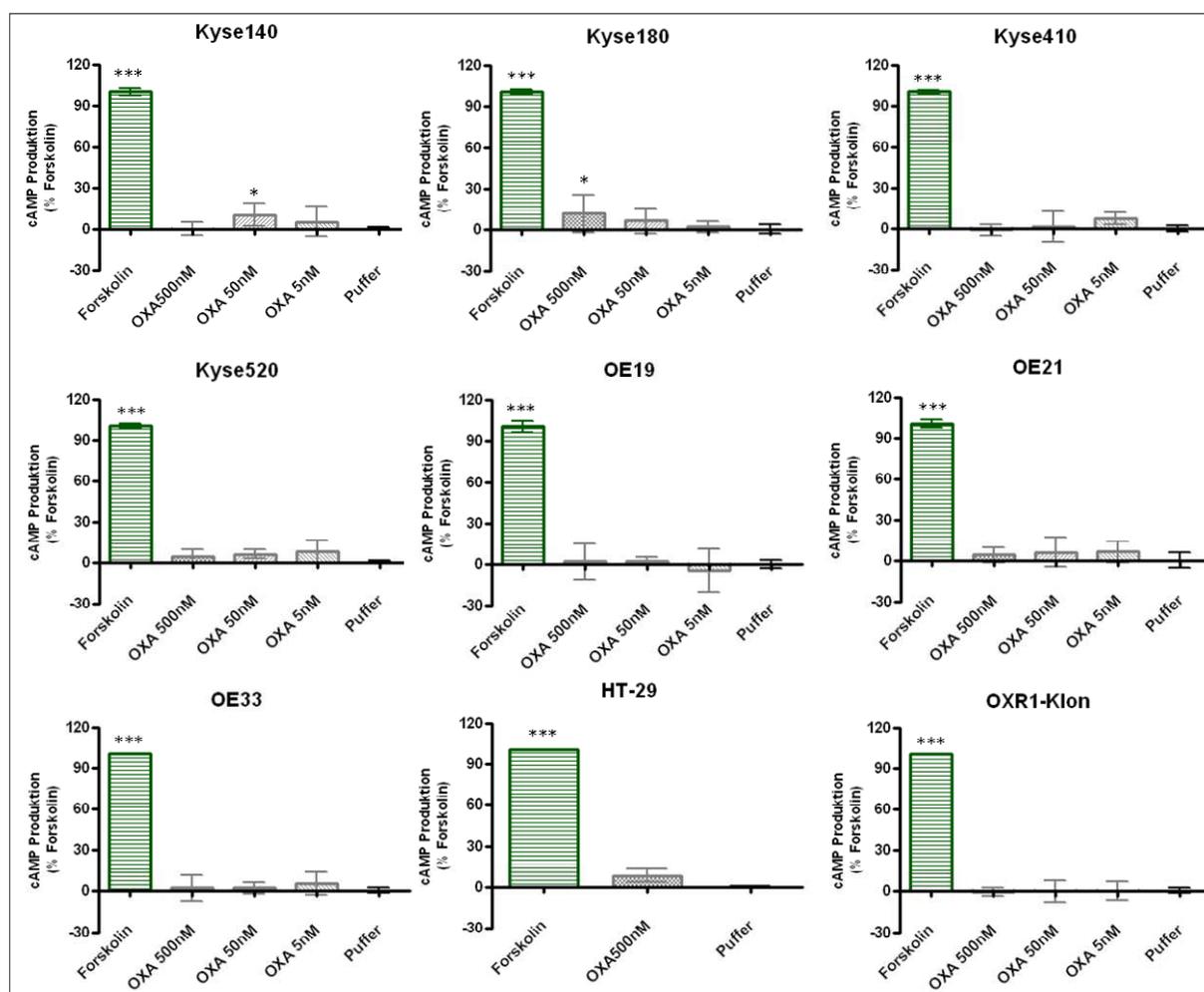


Abb. 31: Anstieg des zytoplasmatischen cAMP-Spiegels nach OXA-Applikation. Außer den Kyse180- und Kyse140-Zelllinien reagiert keine weitere untersuchte Zelllinie mit einem Anstieg der zytoplasmatischen cAMP-Konzentration auf OXA. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte \pm SD n = 3 (je Duplikate). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ANOVA Test bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ % ($P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ *** vs Puffer (schwarz)).

In den Grafiken in Abb. 31 ist die cAMP-Produktion für die verschiedenen Zelllinien in Prozent bezogen auf die Positivkontrolle (grün) aufgetragen. Der in Abb. 31 gezeigte Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Forskolin-Inkubation war in allen gezeigten Zelllinien signifikant. Einen Anstieg der cAMP-Konzentration nach OXA-Applikation (grau) war in den Kyse140- und 180-Zellen zu detektieren. Die Kyse180-Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des cAMP-Spiegels nach Applikation von 500 nM OXA. Die niedrigeren Konzentrationen an OXA führten nicht zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration. Im Fall der Kyse140 war bei der mittleren (50 nM) Konzentration an OXA eine signifikante Erhöhung der cAMP-Konzentration zu verzeichnen. Die Kyse410 und 520 zeigten keinen signifikanten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration nach OXA-Gabe.

In den OE-Zelllinien, den HT-29-Zellen und dem OXR1-Klon waren keine signifikanten Anstiege der cAMP-Konzentration nach OXA-Gabe zu verzeichnen. Lediglich die positiven Kontrollen lösten in allen untersuchten Zelllinien signifikante Erhöhungen der cAMP-Produktion aus.

Regulation der zellulären cAMP-Konzentration – $G\alpha_i$

Mit dem gleichen cAMP-Kit ist es möglich, eine Erniedrigung des cAMP-Spiegels zu bestimmen, was auf eine $G\alpha_i$ -Kopplung des Rezeptors weist. Eine Erniedrigung wird untersucht, indem zunächst die Zellen mit OXA inkubiert und anschließend mit Forskolin stimuliert werden. Liegt eine $G\alpha_i$ -Kopplung des Rezeptors vor, ist der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in der Probe mit vorheriger OXA-Inkubation signifikant niedriger im Vergleich zu einer positiven Kontrolle nur mit Forskolin. Um keine Effekte zu verlieren, wird diese Untersuchung normalerweise bei der EC_{80} -Konzentration von Forskolin durchgeführt, die für jede Zelllinie einzeln bestimmt werden muss. Von der Bestimmung der EC_{80} von Forskolin wurde jedoch erst einmal abgesehen. Dieser Versuch wurde bei einer Standardkonzentration von 5 μ M Forskolin für alle Zelllinien durchgeführt, um evtl. Tendenzen einer Erniedrigung des cAMP-Spiegels zu beobachten. Vielversprechende Zelllinien wurden dann im Einzelnen genauer untersucht.

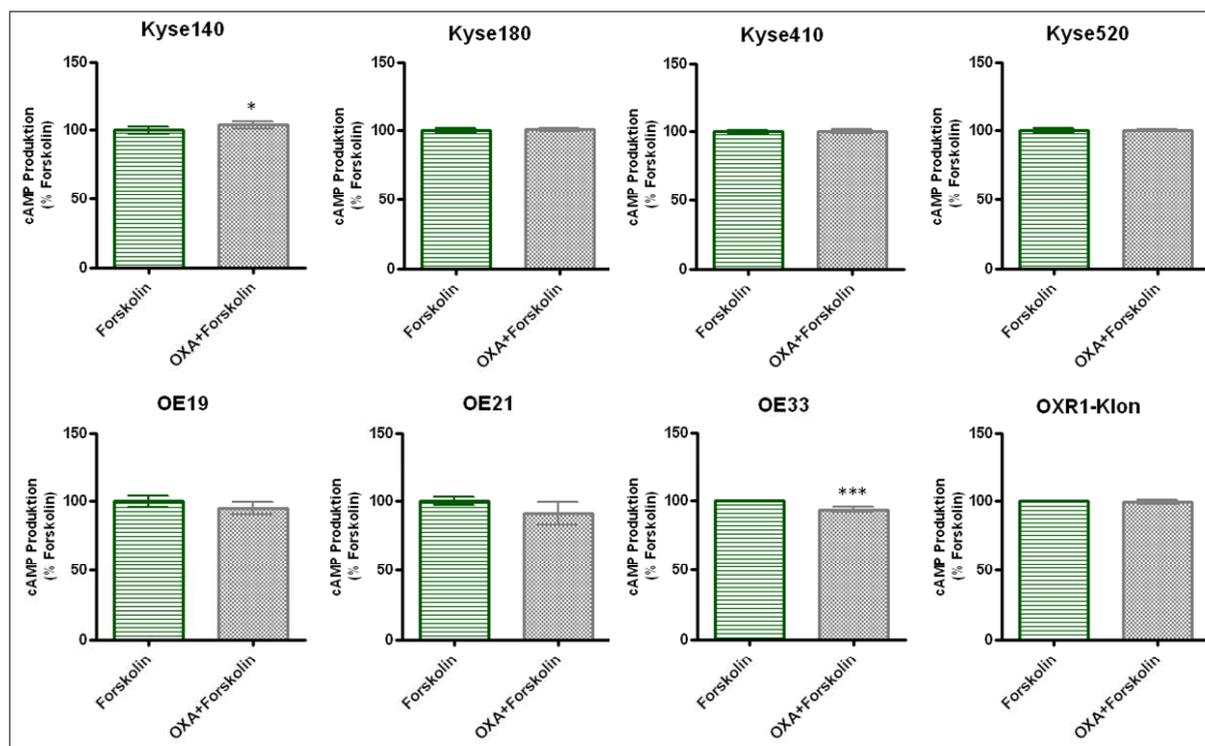


Abb. 32: Reduktion des zytoplasmatischen cAMP-Spiegels nach OXA-Applikation vor und während der Stimulation mit Forskolin. Eine Reduzierung der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Forskolin-Stimulation zeigen nur die OE33-Zellen, die Kyse140-Zellen zeigen nach OXA und Forskolin-Applikation eine Erhöhung des cAMP-Spiegels im Vergleich zur Stimulierung nur mit Forskolin. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte \pm SD $n=3$ (je Duplikate). Die Statistische Auswertung erfolgte mit einem Paired t Test bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ % ($P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***).

Die Abb. 32 zeigt für alle Ösophagus-Zelllinien die cAMP-Produktion mit Forskolin allein sowie mit OXA und Forskolin zusammen (OXA+Forskolin). Die Kyse140-Zellen zeigten eine unerwartete signifikante Erhöhung des cAMP-Spiegels nach OXA+Forskolin-Inkubation im Vergleich zur einfachen Stimulierung mit Forskolin, die jedoch sehr niedrig war. Bei allen anderen gezeigten Kyse-Zelllinien konnten keine Veränderungen der cAMP-Produktion beobachtet werden (Abb. 32). Die cAMP-Reduktion nach OXA+Forskolin-Stimulierung in den OE-Zelllinien war bei den OE19- und OE21-Zellen nicht signifikant. Jedoch zeigten die OE21-Zellen eine Tendenz zur Reduktion des intrazellulären cAMP nach OXA-Gabe im Vergleich zur Forskolin-Stimulierung. Die Reduktion der cAMP-Konzentration nach OXA-Applikation war in den OE33-Zellen signifikant. Der OXR1-Klon zeigte keine Erniedrigung des cAMP-Spiegels und somit keine $G\alpha_i$ -Kopplung des OXR1 in diesen Zellen.

Die Reduktion der cAMP-Produktion nach OXA-Stimulation konnte in OE33- und in OE21-Zellen gezeigt werden, wobei nur die Reduktion in den OE33-Zellen signifikant war. Dieser Effekt wurde daraufhin detaillierter untersucht. Hierfür war zunächst die Bestimmung der EC_{80} für Forskolin notwendig. Es wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve für Forskolin mit OE33, OE21 und dem OXR1-Klon erstellt. Anhand der entstandenen Konzentrationskurve und einer mitgeführten Standardkurve konnten die EC_{80} -Werte ermittelt werden.

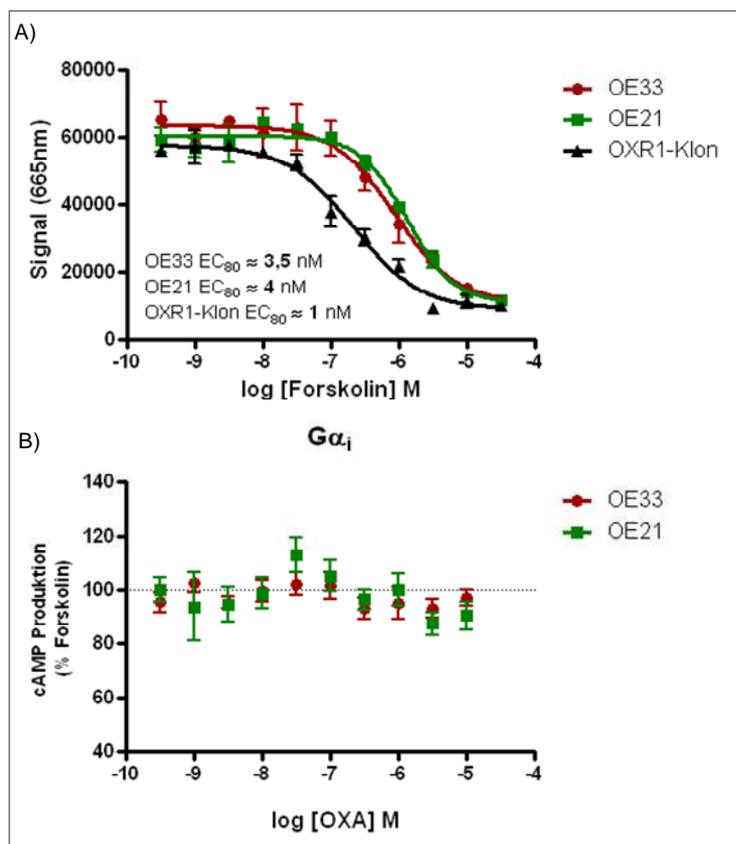


Abb. 33: A) Konzentrationskurve für Forskolin auf den cAMP Spiegel. B) Konzentrationskurve für OXA bei der jeweiligen EC₈₀ von Forskolin auf den cAMP-Spiegel.

A) Anstieg der cAMP-Konzentration nach ansteigender Forskolin Applikation. Mit einer EC₈₀ von 3,5 nM in den OE33-Zellen, EC₈₀ von 4 nM OE21-Zellen und EC₈₀ von 1 nM OXR1-Klon. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte ± SEM n = 1 (je 4 Replikate).

B) In beiden untersuchten Zelllinien ist keine konzentrationsabhängige Reduktion des cAMP-Spiegels zu detektieren. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte ± SEM n = 3 (je 4 Replikate).

Abb. 33 A zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven für Forskolin in OE33, OE21 und dem OXR1-Klon. Für den OXR1-Klon wurde eine EC₈₀ von ca. 1 nM ermittelt. Die EC₈₀-Werte für die OE33- und OE21-Zellen liegen bei ca. 3,5 und 4 nM.

Es wurden drei unabhängige Konzentrations-Wirkungskurven mit OXA bei der jeweiligen EC₈₀ für Forskolin untersucht (Abb. 33 B). Die Abb. 33 B zeigt die cAMP-Produktion der OE21- und OE33-Zellen nach OXA und Forskolin-Inkubation. Die gestrichelte Linie zeigt die maximale cAMP-Produktion bei der EC₈₀ für Forskolin. Alle gemessenen Punkte, die unterhalb dieser 100 % liegen, zeigen eine Reduktion des cAMP-Spiegels und somit eine G_{α_i}-Kopplung des OXR1 an. Wie in der Abb. 33 B zu sehen ist, schwanken die gemessenen Werte um die 100 % unabhängig von der OXA-Konzentration. Demnach konnte keine OXA-Konzentrationsabhängigkeit einer Reduktion bzw. eines Anstiegs der cAMP-Konzentration in den OE21-, OE33-Zellen und dem stabilen OXR1-Klon (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden.

3.3.2.2 OXR1-vermittelte β -Arrestin-Signalwege in humanen Tumorzelllinien**Veränderungen des Zytoskeletts aufgrund von Signaltransduktion - BIND**

Um eine Funktionalität des endogenen OXR1 in unterschiedlichen Zelllinien unabhängig von G-Kopplung zu untersuchen, wurde die BIND®-Technologie (Biomolekulare Interaktions-Detektion) benutzt. Dies ist eine markierungsfreie Detektionsmethode, die die Summe der zellulären Antworten nach GPCR-Stimulierung misst. Dieses System ist in der Lage, jegliche Rezeptoraktivität abzubilden, die aufgrund einer Peptid-Rezeptor-Bindung induziert wird. Als Positivkontrolle diente ein Peptidmix aus ATP, Carbachol, Neurotensin und Bradykinin. Zu den Negativkontrollen wurde nur der Inkubationspuffer appliziert. Die Antwort auf 500 nM des zyklischen OXA wurde über 60 min untersucht. Die Rohdaten wurden normiert (maximaler Mittelwert der positiven Kontrollen) und die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche über die Zeit aufgetragen.

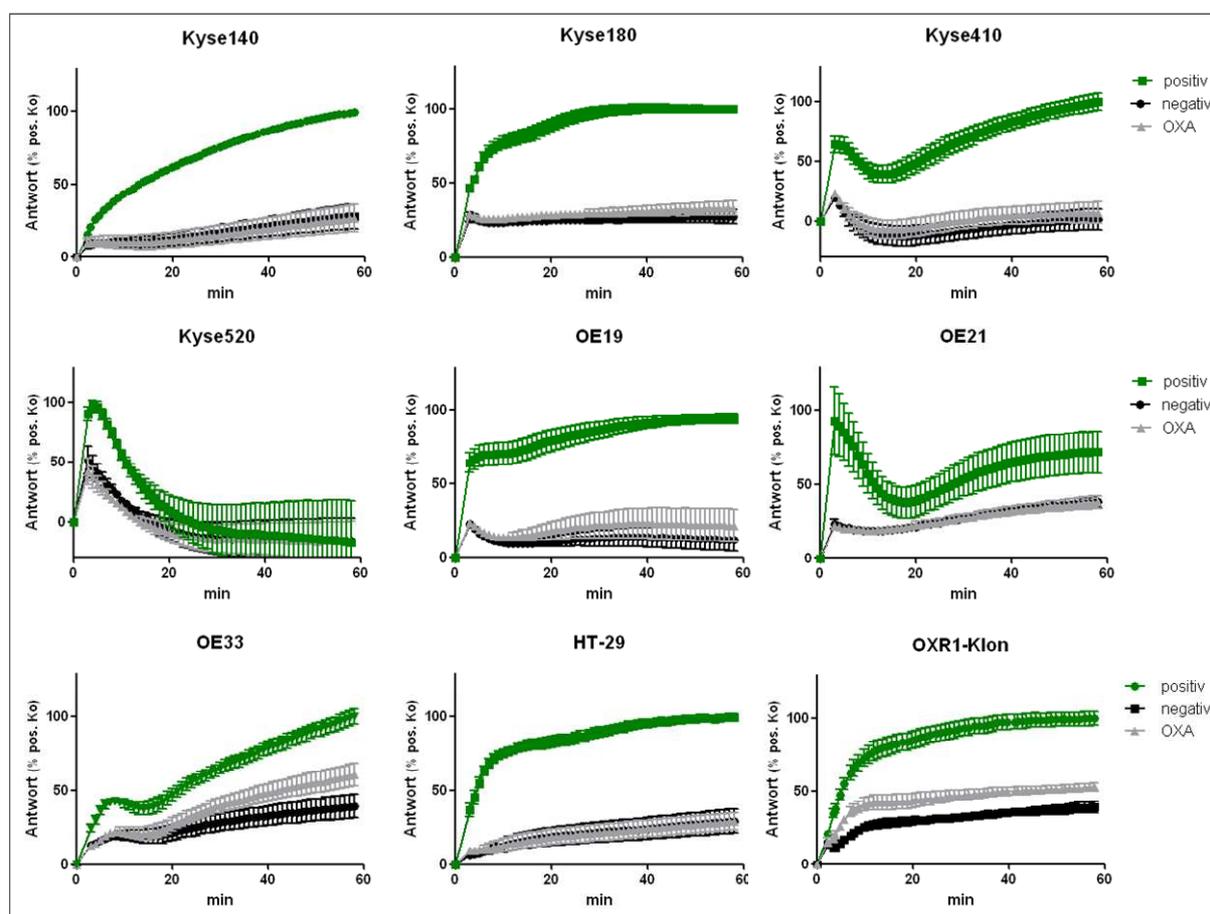


Abb. 34: Zeit-Zellantwort-Kurven in Ösophagus-Zelllinien, HT-29-Zellen und dem OXR1-Klon nach OXA-Applikation. Positivkontrolle (grün), Negativkontrolle (schwarz), OXA (grau). Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte \pm SEM, n = 3 (je 4 Replikate).

In allen in der Abb. 34 dargestellten Zelllinien konnte eine deutliche Antwort auf die Positivkontrolle (grün) induziert werden. Der Kurvenverlauf nach Applikation des OXA (grau) unterschied sich jedoch nicht zu dem der negativen Pufferkontrollen (schwarz). Es konnte keine signifikante Antwort auf OXA mit dem BIND-System in Ösophagus-Zelllinien und den HT-29-Zellen gemessen werden.

Die OE33-Zellen, OE19-Zellen und der stabile OXR1-Klon zeigten eine etwas erhöhte Antwort nach OXA-Applikation im Vergleich zur negativen Kontrolle. Die statistische Auswertung (ANOVA Test) am Zeitpunkt $t = 60$ min ergab jedoch, dass diese Erhöhung in keiner Zelllinie signifikant war.

Aufnahme des Liganden in die Zelle – Internalisierung

Ob ein GPCR funktional ist, kann auch durch die Internalisierung des Peptid-Rezeptor-Komplexes nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde die Internalisierung des fluoreszenzmarkierten OXA (OXA-IDCC) untersucht. Hierzu wurden OXR1 transient transfizierte Hek293a-Zellen, der OXR1-Klon, Hek293a WT-Zellen sowie Kyse- und OE-Zellen mit dem OXA-IDCC und Kontrollen (2.2.3.6.) 30 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und unter dem LSM analysiert.

Die Abb. 35 zeigt die Internalisierung des OXA-IDCC B) und C) und die Verdrängung des OXA-IDCC mit dem unmarkierten OXA A) in verschiedenen Zelllinien.

Die OXR1 transient transfizierten Hek293a-Zellen zeigten, wie erwartet, eine intensive Fluoreszenz einzelner Zellen (Abb. 35 B und C). Die Lokalisation der Fluoreszenz war schwer zu bestimmen; sie schien sich in den Zellen und an der Membran zu konzentrieren. In den Kontrollen (ungefärbt, IDCC und Kontrollpeptid Chem9sc-IDCC) war keine Fluoreszenz zu detektieren (nicht gezeigt). Die Verdrängung des OXA-IDCC mit dem unmarkierten OXA (Abb. 35 A) zeigte eine sehr geringe Fluoreszenz. Diese Beobachtungen führten zusammen zu der Annahme einer spezifischen Bindung des OXA-IDCC an den OXR1 und einer teilweisen Internalisierung des OXA-IDCC. In dem stabilen OXR1-Klon war eine Fluoreszenz nach OXA-IDCC Inkubation detektierbar (Abb. 35 B und C) die mittels des unmarkierten OXA verdrängt werden konnte (Abb. 35 A). Die Fluoreszenzintensität war geringer im Vergleich zu den OXR1 transient transfizierten Hek293a-Zellen, und das Färbemuster war ein anderes. Es waren fluoreszierende Punkte zu sehen, die sich in allen Zellen befanden. Diese Art von Fluoreszenzmuster wies auf eine vollständige Internalisierung des OXA-IDCC hin, welches zusammen mit dem Rezeptor in Endosomen konzentriert wird. Diese fluoreszierenden Vesikel waren in jeder Zelle zu sehen, was bei einer stabilen Zelllinie auch zu erwarten ist. Die Kontrollen (ungefärbt, IDCC und Chem9sc-IDCC) des OXR1-Klons waren negativ (nicht gezeigt), was eine spezifische Bindung vermuten ließ. Zusammenfassend ist zu sagen, dass alle gemachten Beobachtungen auf eine spezifische OXR1 vermittelte Internalisierung des OXA-IDCC-Komplexes im OXR1-Klon hinweisen. Das gleiche Muster der Experimente wurde bei Hek293a-WT-Zellen angewendet. Diese zeigten zwar einige Fluoreszenzsignale B). In der Überlagerung mit dem Durchlicht C) war jedoch eindeutig zu erkennen, dass diese Fluoreszenz außen an den Zellen zu haften schien. Diese scheinbar unspezifische Bindung des OXA-IDCC ließ sich genauso verdrängen A). Alle anderen Zelllinien wurden auch auf Internalisierung des OXA-IDCC untersucht, hier in Abb. 35 exemplarisch dargestellt die Kyse180-Tumorzelllinie. Die Kyse180-Zellen, wie auch alle anderen Kyse- und OE-Zellen zeigten eine ganz schwache Fluoreszenz nach OXA-IDCC-Inkubation (Abb. 35 B und C) Sie war jedoch nicht sichtbar blockierbar mit dem nichtmarkiertem OXA.

Diese Immunfluoreszenzen waren aufgrund der schwachen Fluoreszenz und der Sensitivitätsgrenze des LSM nicht auswertbar.

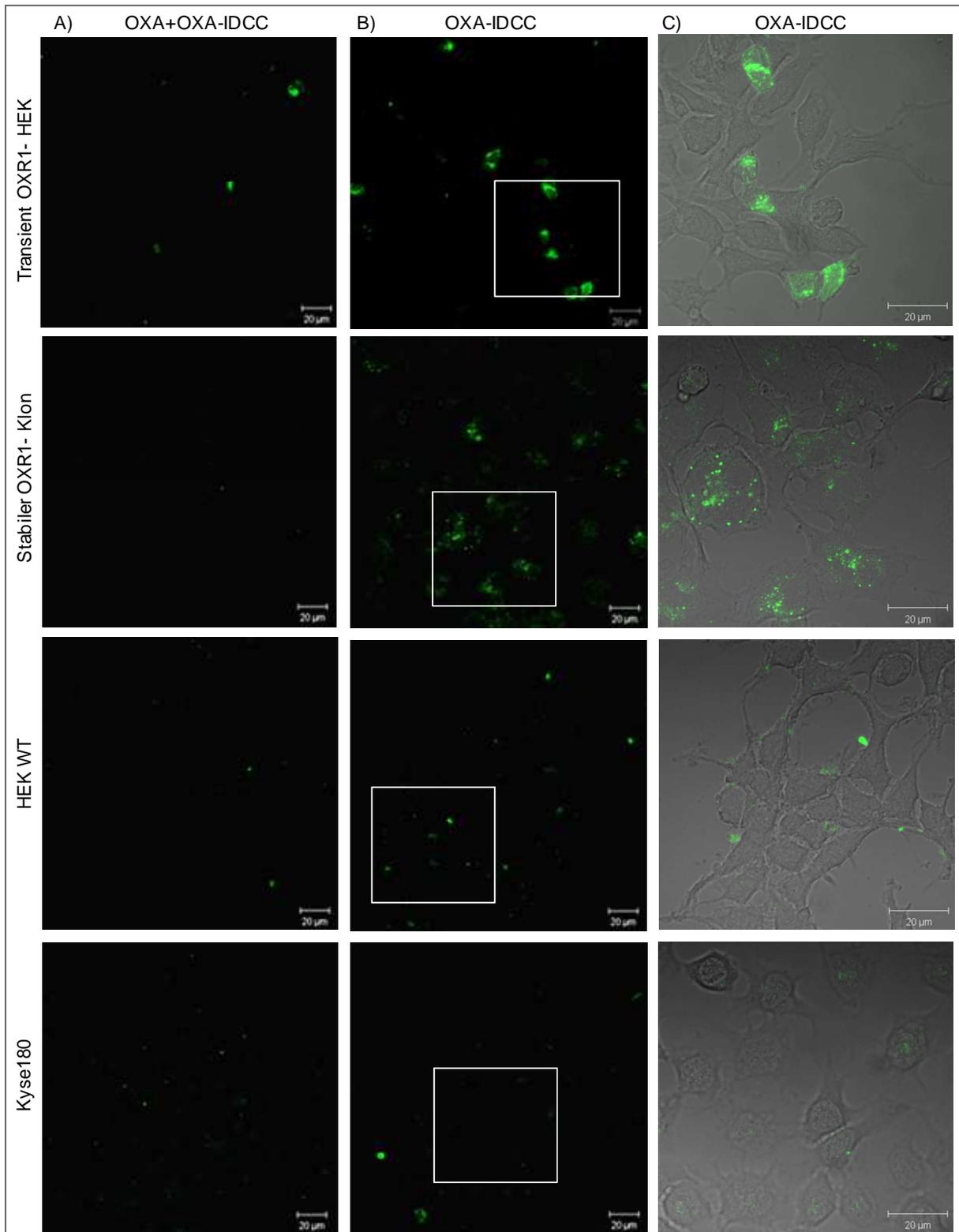


Abb. 35: Internalisierung von OXA-IDCC. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit OXA-IDCC wurden die Zellen fixiert und anschließend mit einer 400-fachen Vergrößerung am LSM aufgenommen. A) Verdrängung des OXA-IDCC mit unmarkiertem OXA. B) und C) OXA-IDCC. Es ist eine Internalisierung des OXA-IDCC in die OXR1 transient transfizierten Hek293-Zellen und dem OXR1-Klon zu sehen, die mit dem OXA verdrängt werden kann.

Um die Aufnahme des OXA-IDCC sensitiver beobachten zu können, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Mehrere Ösophaguszelllinien, die HT-29-Zelllinie als exemplarisches Beispiel einer kolorektalen Tumorzelllinie und die MiaPaca2-Zelllinien als Beispiel einer pankreatischen Tumorzelllinie wurden mittels des Durchflusszytometers auf die Aufnahme des OXA-IDCC getestet. Außerdem wurde eine Verdrängung des OXA-IDCC mittels des OXR1 spezifischen Antagonisten SB-334867 (SB) und dem unmarkierten OXA vorgenommen. Dazu wurden die Zelllinien jeweils ungefärbt (Ko), mit dem freien Farbstoff (IDCC), dem IDCC markiertem Chem9sc-Peptid (Chem9sc-IDCC) und dem zu untersuchenden OXA-IDCC für 30 min inkubiert. Im Durchflusszytometer wurden dann die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) und der Anteil IDCC-positiver Zellen in Prozent bestimmt (2.2.3.6, Abb. 11). Zunächst wurden transient mit dem OXR1 transfizierte Hek293a, der stabile OXR1-Klon und Hek293a-WT-Zellen untersucht, um die Eignung der Methode zu prüfen.

In den folgenden Abbildungen ist in **A**) die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der einzelnen Proben aufgetragen, normiert auf die Probe mit dem freien Farbstoff (IDCC). In **B**) sind die IDCC positiven Zellen in Prozent der Population P1 zu sehen.

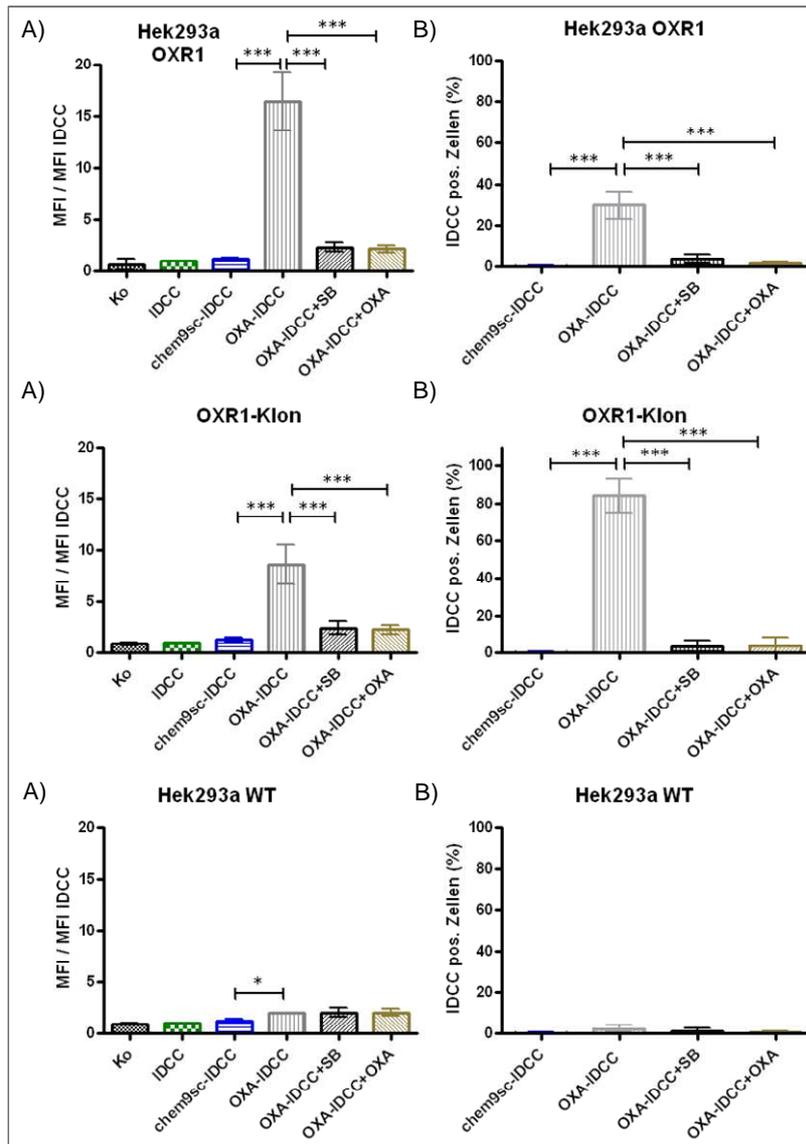


Abb. 36: Aufnahme des OXA-IDCC.

Durchflusszytometrische Detektion der A) mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) B) und der IDCC positiven Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit OXA-IDCC (grau). Es ist ein Anstieg der MFI und der IDCC positiven Zellen nach OXA IDCC (grau) Inkubation im Vergleich zu den Kontrollen (Ko = schwarz, IDCC = grün, Chem9sc-IDCC = blau) detektierbar. Dieser Anstieg wird mit dem OXR1-Antagonisten SB-334867 (SB = schwarz) und dem unmarkierten OXA (braun) verdrängt. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte \pm SD n = 3. Die Statistische Auswertung erfolgte mit einem ANOVA Test bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ % (P < 0,05 *, P < 0,01 **, P < 0,001 ***).

In Abb. 36 A ist zu sehen, dass die Pufferkontrolle Ko (schwarz), wie die Kontrolle mit freiem Farbstoff IDCC (grün) und dem Chem9sc-IDCC (blau) kaum zu einem Anstieg der MFI führten. Die Inkubation mit OXA-IDCC (grau) jedoch führte in allen Fällen zu einem signifikanten Anstieg der MFI. Die OXR1 transient transfizierten Zellen zeigten eine im Mittel 16-fache Erhöhung der MFI, wohingegen im stabilen OXR1-Klon ein 9-facher Anstieg der MFI zu verzeichnen war. Bei den Hek293a-WT-Zellen war ein doppelter MFI im Vergleich zum IDCC (grün) zu messen. Dies war der erste Hinweis auf eine spezifische Bindung bzw. Aufnahme des OXA-IDCC der Zellen. Weiter wurde mittels statistischer Tests ausgewertet, ob die Blockierung mit SB-334867 (SB) (schwarz) und dem unmarkierten OXA (braun) zu einer signifikanten Erniedrigung der MFI führt. Damit konnte im Falle der OXR1 transient transfizierten Zellen und dem stabilen OXR1-Klon eine spezifische Verdrängung des OXA-IDCC (grau) mit dem SB-334867 (SB) (schwarz) und dem unmarkierten Peptid OXA (braun) nachgewiesen werden. Bei den Hek293a-WT-Zellen konnte zwar eine signifikante Erhöhung des MFI jedoch keine spezifische Verdrängung des Signals gezeigt werden (Abb. 36 A). Genauso verhielt es sich bei den IDCC positiven Zellen (Abb. 36 B). Die transient mit OXR1

transfizierten Hek293a-Zellen zeigten im Mittel 30 % IDCC positive Zellen nach OXA-IDCC-Inkubation (grau). Von denen konnten 88 % erfolgreich mit dem SB-334867 (SB) (schwarz) und 95 % mit dem unmarkierten OXA (braun) verdrängt werden (Abb. 36 B, Tab. 9). Im Mittel waren 84 % der Zellen des stabilen OXR1-Klons IDCC positiv, wobei 96 % davon mit dem SB-334867 (SB) (schwarz) und 95 % mit dem unmarkierten OXA (braun) verdrängt werden konnten (Abb. 36 B, Tab. 9). In den Hek293a-WT-Zellen konnten 1 bis 2 % IDCC positive Zellen detektiert werden, die nicht verdrängt werden konnten (Abb. 36 B, Tab. 9).

Nachdem die oben beschriebenen Kontrollen das Durchflusszytometer als brauchbare Detektionsmethode von Peptid-IDCC positiven Zellen angezeigt haben, wurden alle bisher untersuchten Ösophaguszelllinien, HT-29-Zellen und MiaPaca2-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

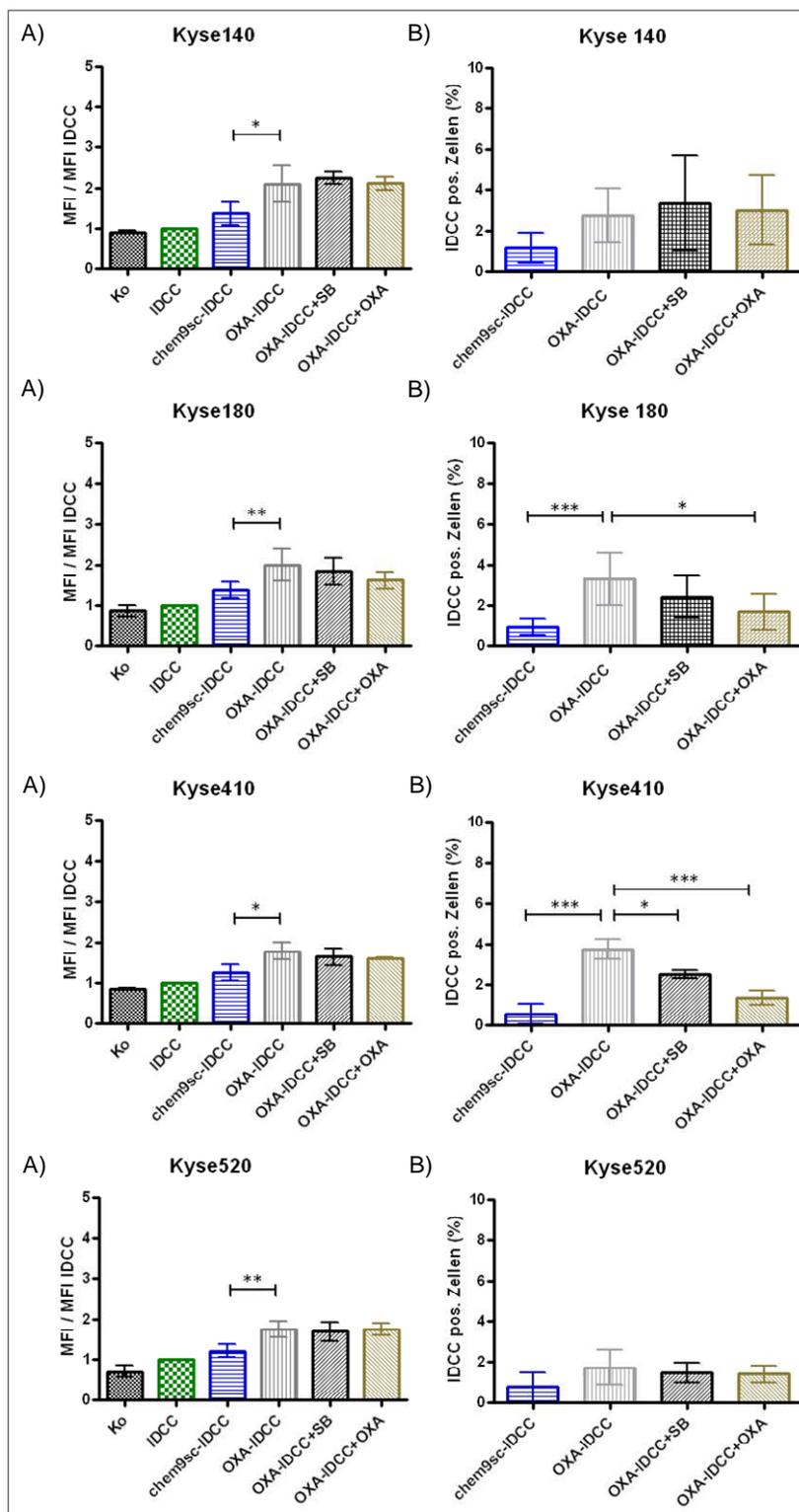


Abb. 37: Aufnahme des OXA-IDCC.

Durchflusszytometrische Detektion der **A)** mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) **B)** und der IDCC positiven Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit OXA-IDCC (grau). A) Es ist ein Anstieg der MFI nach OXA-IDCC (grau) Inkubation im Vergleich zu den Kontrollen (Ko = schwarz, IDCC = grün, Chem9sc-IDCC = blau) detektierbar. Dieser Anstieg wird nicht mit dem OXR1-Antagonisten SB-334867 (SB = schwarz) und dem unmarkierten OXA (braun) verdrängt. B) Ein Anstieg der IDCC positiven Zellen nach OXA-IDCC (grau) Inkubation ist nur in den Kyse180- und 410-Zellen detektierbar. Dieser Anstieg wird mit dem unmarkierten OXA (braun) verdrängt. Nur in den Kyse410-Zellen kann der Anstieg mit dem OXR1-Antagonisten SB-334867 (SB=schwarz) verdrängt werden. Aufnahme des OXA-IDCC. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte \pm SD n = 3. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ANOVA Test bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ % ($P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***).

Die Abb. 37 zeigt die durchflusszytometrische Analyse der Kyse-Zellen nach Peptid-IDCC-Inkubation. Alle Kyse-Zellen zeigten hier nach OXA-IDCC-Inkubation einen signifikanten Anstieg der MFI im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen (Abb. 37 A). Dieser MFI-Anstieg war jedoch in keiner der gezeigten Zelllinien signifikant verdrängbar mit dem SB-334867 (SB) (schwarz) oder dem unmarkierten OXA (braun) (Abb. 37 A). Ein Hinweis auf eine Peptid-Rezeptor-Bindung und Aufnahme des OXA-IDCC wurde bei den Kyse180-Zellen und

Kyse410-Zellen (Abb. 37 B) mit der Detektion signifikant erhöhter IDCC positiver Zellen bestätigt. Der Anstieg IDCC positiver Zellen konnte im Falle der Kyse410-Zellen zu im Mittel 32 % (SB-334867) bzw. 62 % (OXA) signifikant durch SB-334867 und OXA aufgehoben werden (Tab. 9). OXA-IDCC positive Kyse180-Zellen (Abb. 37 B) konnten genauso mittels des Antagonisten SB-334867 und des unmarkierten OXA verdrängt werden, wobei diese Verdrängung von 39 % der IDCC positiven Zellen nur im Falle des unmarkierten OXA signifikant war (Tab. 9). Der Anteil IDCC positiver Zellen betrug jedoch in allen Zelllinien unter 5 %.

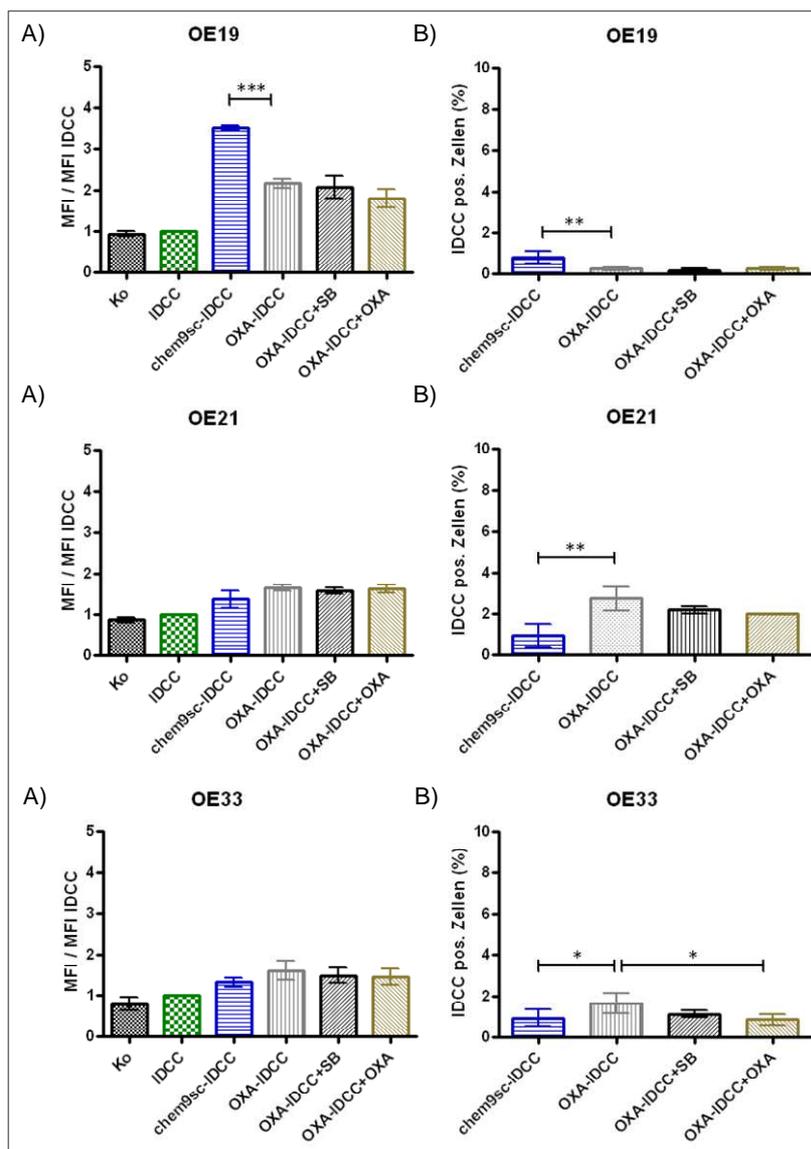


Abb. 38: Aufnahme des OXA-IDCC.

Durchflusszytometrische Detektion der **A)** mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) **B)** und der IDCC positiven Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit OXA-IDCC (grau). **A)** Es ist in keiner gezeigten Zelllinie ein Anstieg der MFI nach OXA-IDCC (grau) Inkubation im Vergleich zu den Kontrollen (Ko = schwarz, IDCC = grün, Chem9sc-IDCC = blau) detektierbar. **B)** Ein Anstieg der IDCC positiven Zellen nach OXA-IDCC (grau) Inkubation ist in den OE21- und OE33-Zellen detektierbar. Dieser Anstieg wird mit dem unmarkierten OXA (braun) verdrängt im Falle der OE33-Zellen. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte \pm SD $n = 3$. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ANOVA Test bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ % ($P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***).

Die in Abb. 38 gezeigten OE19-Zellen zeigten nach OXA-IDCC (grau) Applikation weder einen Anstieg der MFI noch IDCC positiver Zellen. Dies war aufgrund der fehlenden mRNA- und Proteindetektion des OXR1 (Abb. 22 und Abb. 23) auch zu erwarten. Genauso sind keine Anstiege der MFI in den OE33- und OE21-Zellen zu verzeichnen gewesen (Abb. 38 A). Jedoch konnten signifikant mehr IDCC positive Zellen nach OXA-IDCC (grau) Inkubation in diesen beiden Zelllinien detektiert werden (Abb. 38 B). Es war möglich, im Falle der OE33-Zellen ca. 37 % (Tab. 9) dieser IDCC

positiven Zellen signifikant mittels des OXA (braun) zu verdrängen (Abb. 38 B). Auch in den OE-Zellen lag der Anteil an IDCC positiven Zellen unter 5 % der Zellpopulation.

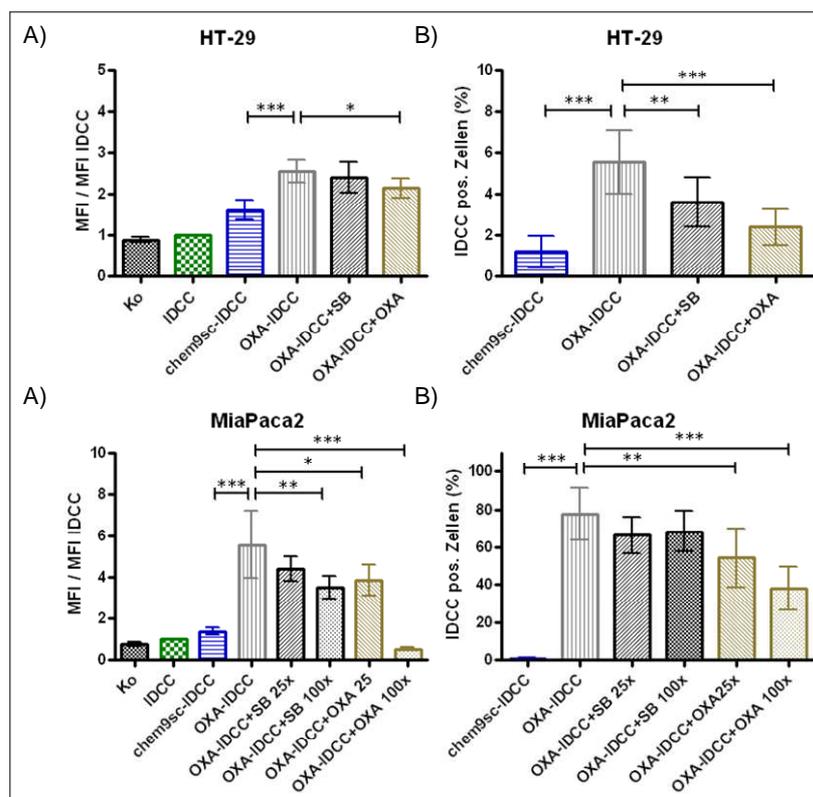


Abb. 39: Aufnahme des OXA-IDCC.

Durchflusszytometrische Detektion der A) mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) B) und der IDCC positiven Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit OXA-IDCC (grau). Es ist ein Anstieg der MFI und der IDCC positiven Zellen nach OXA-IDCC (grau) Inkubation im Vergleich zu den Kontrollen (Ko = schwarz, IDCC = grün, Chem9sc-IDCC = blau) detektierbar. Dieser Anstieg wird mit dem OXR1-Antagonisten SB-334867 (SB = schwarz) und dem unmarkierten OXA (braun) teilweise aufgehoben. Ergebnisse gezeigt als Mittelwerte \pm SD $n = 6$. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ANOVA Test bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ % ($P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***).

Neben den Ösophagus-Zelllinien wurden exemplarisch eine kolorektale Tumorzelllinie (HT-29) und eine pankreatische Tumorzelllinie (MiaPaca2) im Durchflusszytometer untersucht (Abb. 39). Bei beiden Zelllinien konnte eine signifikant höhere MFI der Zellpopulation nach OXA-IDCC (grau) Applikation gemessen werden (Abb. 39 A). In den HT-29-Zellen konnte ein 2,5-facher und in den MiaPaca2-Zellen sogar ein 6-facher Anstieg der MFI registriert werden. Dieser Anstieg der MFI konnte mit OXA (braun) im Falle der HT-29-Zellen signifikant aufgehoben werden. In den MiaPaca2-Zellen war nach der Verdrängung mit (25-fachem und 100-fachem Überschuss) OXA (braun) und 100-fachem Überschuss an Antagonist SB-334867 (schwarz) genauso eine signifikant erniedrigte MFI zu detektieren (Abb. 39 A). Beide gezeigten Zelllinien zeigten auch bei der Detektion IDCC positiver Zellen signifikant höhere Werte nach OXA-IDCC (grau) Inkubation im Vergleich zur Chem9sc-IDCC-Kontrolle (blau) an (Abb. 39 B). Die HT-29-Zellen zeigten im Mittel 6 % IDCC positive Zellen nach OXA-IDCC (grau) Inkubation, wovon ca. 34 % mit dem SB-334867 (schwarz) und 56 % mit dem OXA (braun) signifikant verdrängt werden konnten (Tab. 9). Im Mittel 78 % der MiaPaca2-Zellen wurden nach OXA-IDCC (grau) Inkubation als IDCC positiv registriert (Abb. 39 B). Davon konnten 23 % signifikant mit einem 25-fachen Überschuss und 56 % mit einem 100-fachen Überschuss an OXA (braun) verdrängt werden (Tab. 9).

Tab. 9: Übersicht der IDCC positiven Zellen und deren spezifische Verdrängung in humanen Tumorzelllinien.

Tumorentität	Zelllinie	IDCC pos.Zellen (%)	Verdrängung (%)
Ösophageales Adenokarzinom	OE19	0%	-
	OE33	2%±1	OXA 37%±14
Ösophageales Plattenepithelkarzinom	OE21	3%±1	-
	Kyse140	3%±1	-
	Kyse180	3%±1	OXA 39%±31
	Kyse410	4%±1	SB 32%±15 OXA 62%±17
	Kyse520	2%±1	-
Kolorektales Karzinom	HT-29	6%±2	SB 34%±19 OXA 56%±15
Pankreatisches Karzinom	MiaPaca2	78%±14	SB 100x 16%±8 OXA 25x 23%±12 OXA 100x 56%±11
Überexprimierende Systeme und Kontrollen	Hek293a OXR1 (transient)	30%±7	SB 88%±7 OXA 95%±2
	OXR1-Klon	84%±9	SB 96%±3 OXA 95%±5
	HEK WT	1%±0	-

Tab. 9 fasst noch mal alle in den vorherigen Abbildungen gemachten Beobachtungen in Bezug auf die IDCC positiven Zellen nach OXA-IDCC-Inkubation zusammen und gibt die spezifischen Verdrängungswerte der jeweiligen Zelllinien an, in denen eine signifikante Verdrängung registriert werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Der OXR1 im humanen Gewebe des GIT und Tumorzelllinien

Eine erhöhte OXR-Expression wurden in humanen Nebennierenrindenadenomen, Pheochromozytomen und wie die neuesten Untersuchungen zeigten in humanen kolorektalen Tumorgeweben und Lebermetastasen nachgewiesen (Blanco et al., 2002; Spinazzi et al., 2005; Voisin et al., 2011). Darüber hinaus wurden die Rezeptoren in einer pankreatischen Tumorzelllinie der Ratte (AR42J Zellen) und in diversen humanen Tumorzelllinien des kolorektalen Karzinoms und des Neuroblastoms detektiert (Ammoun, et al., 2006; Blanco et al., 2002; Harris et al., 2002; Laburthe et al., 2010; Rouet-Benzineb et al., 2004; Spinazzi, et al., 2005; Voisin, 2006; Voisin et al., 2011, 2008).

Dieser Literaturhintergrund führte zu der Vermutung, dass auch andere Tumorentitäten eine verstärkte Expression des OXR1 aufweisen könnten. Dies veranlasste mich zur Untersuchung mehrerer humaner gastrointestinaler (GI) Tumoren auf deren OXR1-Expression mit der Intention, diese als Zielstruktur für eine gerichtete Tumordiagnostik und -therapie zu validieren. Hierzu wurde die Expression des OXR1 im Normalgewebe mit der im Tumorgewebe anhand der Signalstärke der Färbung immunhistochemisch verglichen.

Hierzu war die Validierung eines geeigneten Antikörpers (AK) notwendig. Die gezeigte Kolokalisation des N-terminalen, das OXR1 synthetisch angehängten HA-Epitops, mit dem zu untersuchenden OXR1 zeigte im überexprimierten System, dass beide Antikörper den OXR1 detektieren. Dies beweist die Detektion des rekombinant exprimierten OXR1 mittels des kommerziell erhältlichen OXR1-Antikörpers der Firma Santa Cruz in der Immunfluoreszenz. Ein weiterer Hinweis auf die Spezifität des OXR1-Antikörpers konnte durch die Vorinkubation des Antikörpers mit dem immunogenen Peptid gewonnen werden. Die mit dem vorinkubierten OXR1-Antikörper immunhistochemisch behandelten Gewebeschnitte zeigten keine Färbung im Gegensatz zu den Gewebeschnitten die mit dem nicht vorinkubierten Antikörper gefärbt wurden. Die fehlende Färbung zeigte, dass keine weiteren unspezifischen Epitope durch den Antikörper detektiert wurden. Der letzte Schritt zur Validierung des Antikörpers war der Vergleich des Färbemusters mit einem unabhängig erzeugten OXR1-Antikörper der Firma Alomone. Beide Antikörper zeigten ein identisches Färbemuster im humanen Normal- und Tumorgewebe. Die Färbung des OXR1-AK von Santa Cruz zeigte im Falle des gesunden ösophagealen Plattenepithels eine zusätzliche Färbung der Basalmembranzellen und eine stärkere Färbung des Pankreas-Karzinoms. Die wenigen Unterschiede der Färbungen bzw. die Intensitätsunterschiede könnten mit der unterschiedlich starken Detektion verschiedener Splicevarianten des OXR1 erklärt werden. Beide Antikörper entstammen unterschiedlichen Tierspezies (Ziege und Kaninchen) und erkennen unterschiedliche Epitope (C-Terminus und dritte IZD) des humanen bzw. des Ratten-OXR1. In Anbetracht der Unterschiede der

verwendeten AK war das übereinstimmende Färbemuster auf humanen Kryogewebe beeindruckend aussagekräftig. Zusammenfassend wurde durch alle Validierungsschritte gezeigt, dass der OXR1 AK von Santa Cruz den humanen OXR1 in der Immunfluoreszenz und der Immunhistochemie spezifisch detektierte und somit für die Untersuchung der Expression des humanen OXR1 verwendet werden konnte.

Das Vorkommen des OXR1 im Magen konnte von Ehrström et al., 2005b mit histochemischen Methoden nachgewiesen werden, wobei sich ein zytoplasmatisches Färbemuster mukosaler Epithelzellen im Corpus des Magens darstellte. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit nur bedingt bestätigt werden. So zeigte sich eine diffuse Hintergrundfärbung in allen Proben des Magens. Das Normalgewebe des Magens zeigte eine leichte feinkörnige teilweise diffus wirkende Färbung der Mukosa. Im Vergleich dazu zeigten die Magenkarzinome eine etwas stärkere, spezifische und teilweise sogar eine membranständige Färbung einiger Tumorzellen. Der OXR1 konnte mit dieser Arbeit somit das erste Mal in humanen Magenkarzinomen nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Signalintensität der Färbung im Tumor im Vergleich zu anderen Tumorentitäten und die nur auf einige Tumorzellen beschränkte Detektion des Rezeptors wurde das Magenkarzinom in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Aus der Literatur gibt es Hinweise auf das Vorkommen der OXR und deren Liganden in weiteren Geweben des Gastrointestinaltrakts (GIT). So detektierten Kirchgessner & Liu die mRNA des Vorläufer Peptids PPO und den OXR im Dünndarm von Ratten (Kirchgessner & Liu, 1999). Es folgten Arbeiten, in denen PPO, OXA, OXB und deren Rezeptoren im enterischen Nervensystem (ENS), im speziellen in Nervenzellen der myenterischen und submukosalen Plexus, nachgewiesen wurden. Des Weiteren wurden die Liganden in endokrinen Zellen in der Dünndarmmukosa von Ratten, Meerschweinchen und Menschen gefunden. Der OXR1 wurde in humanen und Ratten-Dünndarm neben dem ENS auch in Epithelzellen gefunden. (Ehrström, et al., 2005a; Ehrström, et al., 2005b; Kirchgessner & Liu, 1999; Nakabayashi et al., 2003a; Näslund et al., 2002b). Die Expression des OXR1 im Dünndarm in den myenterischen und submukosalen Plexus und zusätzlich in Epithelzellen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, wobei die dem Dünndarm analoge Expression des humanen OXR1 im Dickdarm mit dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte. Der myenterische Plexus liegt zwischen Ring- und Längsmuskulatur und reguliert somit die Peristaltik. Es wurde bereits in mehreren Untersuchungen gezeigt, dass OXA in der Peripherie die Peristaltik, also den MMC (*migrating motor complex*) in Ratten und Meerschweinchen über OXR1 negativ beeinflusst und es zu einer Relaxation der glatten Muskulatur kommt (Ehrström et al., 2005a; Ehrström et al., 2003; Kirchgessner & Liu, 1999; Näslund et al., 2002a). Die submukosalen Plexus hingegen registrieren Bestandteile des Darminhalts über afferente Bahnen und regulieren dementsprechend die Sekretion. Dementsprechend konnte eine OXA-vermittelte Bikarbonatsekretion im Dünndarm

induziert werden (Bengtsson et al., 2007; Kirchgessner & Liu, 1999; Okumura et al., 2001; N. Takahashi et al., 1999).

Die Expression von OXR1 in einigen humanen kolorektalen Tumorzelllinien veranlasste bereits vor den in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen die Vermutung, dass OXR1 auch in kolorektalen Tumoren eine erhöhte Expression aufweist (Rouet-Benzineb et al., 2004). Diese Annahme konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Voisin et al., welche im Jahr 2011 mittels quantitativer RT-PCR und immunhistochemischen Färbungen an 40 kolorektalen Tumoren eine OXR1-Färbung zeigten (Voisin et al., 2011). Darüber hinaus konnte in der gleichen Arbeit keine Expression des OXR1 im gesunden Dick- und Dünndarm nachgewiesen werden, dafür jedoch die Erhaltung der OXR1-Expression während der Metastasierung in die Leber. Diese Ergebnisse zeigen das Potential des OXR1 als Zielstruktur für eine gerichtete Diagnostik und Therapie. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten und auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesenen Ergebnisse zur OXR1-Expression im gesunden GIT (Ehrström et al., 2005; Kirchgessner & Liu, 1999; Nakabayashi et al., 2003b; Näslund et al., 2002) zeigten jedoch, dass auch im Normalgewebe des Dick- und Dünndarm der OXR1 vorhanden ist. Die Signalintensität der Färbung im Normalgewebe zeigte sich in den hier untersuchten Präparaten als äquivalent intensiv zu den Tumorgeweben. Die Färbung der Tumorgewebe wies eine Expression des OXR1 in nahezu allen Tumorzellen auf mit einer zum Lumen hin orientierten Ausrichtung der Färbung. Diese Ergebnisse wurden verifiziert durch die Detektion des OXR1 in humanen kolorektalen Tumorzelllinien (Tab. 10). Hierbei konnte die mRNA des OXR1 analog zu schon publizierten Daten in CaCo2-, HT-29-, SW480-, SW620-, Colo205- und T84-Zellen und das Fehlen des OXR1-Transkripts in HCT116-Zellen mittels der quantitativen Echtzeit-PCR ermittelt werden (Rouet-Benzineb et al., 2004; Voisin et al., 2011). Die Expression des OXR1 in Colo320-Zellen und das Fehlen des Rezeptors in DLD1-Zellen wurde mit dieser Arbeit das erste Mal gezeigt. Insgesamt zeigten sich sieben von zehn untersuchten humanen kolorektalen Tumorzelllinien positiv für den OXR1. Gegensätzliche Daten zeigten LS174T-Zellen. Voisin konnte das Transkript in diesen Zellen in seinen Arbeiten detektieren, wohingegen in dieser Arbeit der Rezeptor nicht nachgewiesen werden konnte (Tab. 10). Zusätzlich erfolgte erstmalig der Nachweis des Rezeptors in ausgewählten Zelllinien auf Proteinebene mittels IF-Färbungen. In den CaCo2-, HT-29- und Colo320-Zelllinien konnte der Rezeptor auf Proteinebene nachgewiesen und somit die RNA-Daten verifiziert werden. Alle drei Zelllinien zeigten ein an der Plasmamembran konzentriertes Färbemuster, analog zum OXR1-Klon, was auf eine Membranständigkeit des Rezeptors in diesen Zellen hinweist. In den Colo205-Zellen konnte der OXR1 nicht auf Proteinebene gezeigt werden (Tab. 10).

Tab. 10: Übersicht der OXR1-Expression in humanen kolorektalen Tumorzelllinien und deren Bestätigung durch die Literatur. - OXR1 nicht detektiert; + OXR1 detektiert; nd: nicht durchgeführt

Zelllinie	IF	Taqman	Bestätigt durch
HT-29	+	+	Rouet-Benzineb et al., 2004; Voisin et al., 2011
Caco2	+	+	Rouet-Benzineb et al., 2004; Voisin et al., 2011
Colo205	-	+	Voisin et al., 2011
Colo320	+	+	
SW480	nd	+	Rouet-Benzineb et al., 2004; Voisin et al., 2011
SW620	nd	+	Voisin et al., 2011
T84	nd	+	Voisin et al., 2011
HCT116	nd	-	Rouet-Benzineb et al., 2004; Voisin et al., 2011
DLD1	nd	-	
LS174T	nd	-	Konflikt mit Voisin et al., 2011

Die Literatur zum Nachweis des OXR1 im Pankreas des Menschen ist kontrovers. Es wird in der Literatur davon ausgegangen, dass der OXR1 im humanen Pankreas detektiert wurde, obwohl die dafür angegebenen Referenzen den OXR1 nur in den Inselzellen des Pankreas von Ratten, Mäusen oder Meerschweinchen zeigen (Baccari, 2010; Kirchgessner & Liu, 1999; Ouedraogo et al., 2003). So beschrieb Ehrström et al. die Expression des OXR1 im humanen Pankreas, zeigte jedoch lediglich die Kolo-kalisation von OXA und Insulin in den Inselzellen des humanen Pankreas (Ehrström et al., 2005). OXA konnte in Menschen, Nagetieren und dem Schaf in pankreatischen Inselzellen meist in den β -Zellen nachgewiesen werden. (Dall'Aglio et al., 2010; Ehrström et al., 2005; Göncz et al., 2008; Heinonen et al., 2008; Kirchgessner & Liu, 1999; Nakabayashi et al., 2003a). Zum jetzigen Zeitpunkt wurde erstmalig die Expression des OXR1 im humanen Pankreas in dieser Arbeit gezeigt. Es war eine Färbung der Inselzellen, Endothelzellen und einzelner Gänge zu sehen (Abb. 18). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit das erste Mal die Expression des OXR1 in humanen pankreatischen Adenokarzinomen nachgewiesen werden. Bisher war lediglich der Nachweis des OXR2 in einer pankreatischen Tumorzelllinie der Ratte (AR42J Zellen) der einzige Hinweis auf das Vorkommen von OXR in pankreatischen Tumoren (Harris, 2002). In den Adenokarzinomen des Pankreas zeigte sich eine starke zytoplasmatische Färbung mit dem OXR1-Antikörper. Von den sieben untersuchten pankreatischen Adenokarzinomen zeigten sich sechs positiv für den OXR1, wobei die nahe zu alle Tumorzellen angefärbt waren. Die Färbeintensität des Normalgewebes war gleich die der Tumorzellen. Bestätigend waren hier die Daten der quantitativen Echtzeit-PCR, alle pankreatischen Zelllinien die im Zuge der Arbeit validiert wurden, zeigten eine OXR1-Expression auf RNA-Ebene.

Die Untersuchung der pankreatischen NETs zeigte eine geringere Expression des OXR1 im Vergleich zum Normalgewebe, die auf wenige Tumorzellen konzentriert war. Es konnte in sechs Tumorgeweben eine OXR1-Expression detektiert werden. Die Expression des OXR1 in NETs des Ileums war sehr gering.

Ein noch bisher unbekannter Expressionsort des OXR1 war der Ösophagus. In dieser Arbeit wurde erstmals der OXR1 im humanen Normalgewebe und Tumorgewebe des Ösophagus gezeigt (Abb. 19). In 24 von 25 untersuchten Normalgeweben des Ösophagus konnte eine intensive membranständige Färbung des Plattenepithels detektiert werden. Zusätzlich konnte in einigen Präparaten eine sehr intensive Färbung der meisten Zellen in der Basalmembran nachgewiesen werden. Aus der Literatur geht hervor, dass lediglich der humane Ösophagus auf den Liganden OXA immunhistochemisch und auf RT-PCR-Ebene das Vorhandensein der mRNA des Vorläuferproteins, Präpro-Orexin (PPO) untersucht worden sind. Es konnte jedoch mit beiden Methoden kein OXA im humanen Ösophagus und kein PPO gezeigt werden (Nakabayashi et al., 2003b). Die IHC-Färbungen der Ösophaguskarzinome in vorliegender Arbeit wiesen dagegen den OXR1 in 90 % aller untersuchten Tumore nach. Dabei zeigten 68 % der Tumorzellen der Adenokarzinome eine starke Färbeintensität, wohingegen im Mittel in 98 % der Tumorzellen der Plattenepithelkarzinome eine sehr starke Intensität der Färbung detektiert wurde (Abb. 19, Tab. 6). Unterstützend konnte der OXR1 das erste Mal auf RNA-Ebene und auf Proteinebene in vier von sechs untersuchten humanen ösophagealen Tumorzelllinien gezeigt werden.

Es ist eine Diskrepanz zwischen der Quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse der Tumorzelllinien und dem Nachweis des OXR1 auf Proteinebene mittels der IF bei der Betrachtung der Expressionsstärken zu erkennen. Aus Tab. 7 ist zu entnehmen, dass die beiden Methoden übereinstimmend eine Expression auf mRNA- und Proteinebene detektieren konnten mit Ausnahme der Colo205-Zellen. Auffallend war jedoch, dass sich die Expressionsstärken unterschieden. Beispielsweise zeigte die Colo320-Zelllinie in der Quantitativen Echtzeit-PCR -Analyse eine sehr geringe relative Expression, wohingegen mit der IF ein starkes Signal detektiert werden konnte. Diese Diskrepanzen in der Expressionsstärke sind auf die Modifikation der mRNA, welche die Stabilität dieser und auch die Translationsrate positiv bzw. negativ beeinflussen können, zurückzuführen. Denkbar sind auch posttranslationale Modifikationen, welche die Stabilität, Halbwertszeit und Transportwege bzw. Recyclingeigenschaften eines Proteins maßgeblich verändern. Dies führt zwangsweise zu nicht vergleichbaren Mengen an Rezeptoren auf mRNA und Proteinebene.

In der vorliegenden Arbeit konnten, neben schon publizierten Expressionsorten, neue Expressionsorte des OXR1, wie dem Ösophagus und Pankreas im humanen Normalgewebe immunhistochemisch nachgewiesen werden. Insbesondere die Untersuchung von Tumoren wie der Magenkarzinome, pankretische Adenokarzinome, pankreatische NETs, NETs des Ileum und der Ösophagustumore auf die Expression des OXR1 waren mit der vorliegenden Arbeit das erstmal Gegenstand von

Untersuchungen. Wobei sich diese als positive Expressionsorte für den OXR1 zeigten. Die aus der Literatur bekannte Expression des OXR1 in kolorektalen Karzinomen konnte bestätigt werden.

4.2 Der Orexinrezeptor 1 als molekulare Zielstruktur im Tumor

Für eine gerichtete Tumordiagnostik und -therapie ist es von Vorteil, wenn die Zielstruktur, in diesem Fall der OXR1, ausschließlich im Tumorgewebe zu finden ist oder zumindest eine verstärkte Expression im Tumor vorhanden ist. Ebenfalls von Vorteil erweist sich eine hohe Dichte an Rezeptoren, aus denen nach Bindung des signalgebenden Peptids ein verstärktes Signal resultiert. Der Vorteil eines GPCRs als Tumortarget ist die Lokalisation an der Zellmembran, die einen guten und schnellen Zugang der Leitstruktur (Peptid) über den systemischen Kreislauf gewährleistet. Außerdem sind die GPCRs in der Lage, mit dem markierten Peptid zu internalisieren, was zu einer Akkumulation des signalgebenden Peptids in den Tumorzellen führen und somit in einem besseren Signal-Hintergrund-Verhältnis resultieren kann (Ginj et al., 2006; Liu et al., 2005; Reubi et al., 2010). Die Stabilität der Leitstruktur, also des signalgebenden Peptids im humanen Plasma, ist außerdem von großer Bedeutung für die biologische Verfügbarkeit und damit für eine erfolgreiche Bildgebung.

Die Grundlage für die Untersuchung des OXR1 als molekulare Zielstruktur im Tumor erbrachte die anfänglich, durchgeführte Literaturrecherche, die an dieser Stelle nochmal kurz zusammengefasst wird. Hierbei wurde eine Überexpression des OXR1 in humanen Nebennierenrindennadenomen (Blanco et al., 2002; Spinazzi et al., 2005) und ein verstärktes OXR2-Vorkommen im humanen Pheochromocytomen detektiert (Blanco et al., 2002). Ferner wurde der OXR2 in einer pankreatischen Tumorzelllinie der Ratte (AR42J Zellen) nachgewiesen (Harris, 2002). Zusätzlich war die Expression des OXR1 in humanen Tumorzelllinien des kolorektalen Karzinoms und Neuroblastoms bekannt (Ammoun et al., 2006; Rouet-Benzineb et al., 2004; Voisin, 2006). Die neuesten Untersuchungen zeigen eine Expression des OXR1 in humanen kolorektalen Tumorgeweben und Lebermetastasen (Voisin et al., 2011).

Nach der Validierung der OXR1-Expression im humanen Normal- und Tumorgewebe stellten sich in vorliegender Arbeit die pankreatischen Adenokarzinome, die Kolorektalkarzinome und die Ösophaguskarzinome, im Besonderen hier die Plattenepithelkarzinome, als potentielle Tumorentitäten für die Nutzung des OXR1 als Tumortarget dar. Die Mehrheit der Tumorzellen dieser Tumorentitäten zeigte eine starke bis sehr starke Färbeintensität und somit eine hohe Expressionsdichte des OXR1. Ergänzend dazu wiesen 100 % der untersuchten pankreatischen humanen Tumorzelllinien, 70 % der kolorektalen Tumorzelllinien und 70 % der ösophagealen Plattenepithelkarzinom Tumorzelllinien OXR1-mRNA auf. Ferner wurde der OXR1 in ausgewählten kolorektalen und ösophagealen Tumorzelllinien auf Proteinebene bestätigt. Trotz der geringen Stichprobengröße führten diese drei, an unabhängigen Ebenen festgestellten, Beobachtungen zu dem Schluss, dass der OXR1 in diesen drei Tumorentitäten exprimiert wird.

Die intensive und vollständige Färbung der Tumorzellen im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus wies die höchste Rezeptordichte in dieser Tumorentität im Vergleich zu den anderen untersuchten Tumorentitäten auf. Diese Tatsache und die Bestätigung der Zielstruktur in den ösophagealen Tumorzelllinien führten zur Konzentration dieser Arbeit auf die weitere Validierung des OXR1 als Zielstruktur für die gerichtete Tumordiagnostik und -therapie bei Ösophaguskarzinomen im besonderem bei Plattenepithelkarzinomen.

Auf Grund des OXR1-Nachweises im Normalgewebe des Ösophagus mussten weitere Untersuchungen zur Nutzbarkeit dieser Zielstruktur als Tumortarget getätigt werden. Dazu wurde Tumorgewebe und korrespondierendes Normalgewebe des Ösophagus jedes Patienten immunhistochemisch gefärbt und semiquantitativ ausgewertet, indem die Signalintensitäten und die Expansion der Färbung direkt verglichen wurden.

Es muss darauf aufmerksam gemacht werden, dass bei dem Vergleich von korrespondierendem Normalgewebe mit Tumorgewebe des gleichen Patienten und desselben Organs die als „normal“ deklarierten Gewebeabschnitte schon anfänglicher Entartung unterliegen können. Dies birgt die Gefahr, dass die Überexpression der Zielstruktur im Tumorgewebe im Vergleich zum angenommenen Normalgewebe untergeht, da sie dort die gleiche Dichte zeigt. Um dieses Problem zu umgehen und auch aus Gründen der Verfügbarkeit der Gewebe, ist die weitverbreitete Methodik, auf unabhängiges Normalgewebe oder auch entzündliches Gewebe zurückzugreifen und somit das Tumortarget von entzündlichen Prozessen abgrenzen zu können. Auf der anderen Seite ist genau dies die Herausforderung eines Tumormarkers, diese Situation bildet die „Wirklichkeit“ des späteren Einsatzortes ab und zeigt die Eignung des Markers, zwischen Normal- und Tumorgewebe zu unterscheiden.

Im Falle der Plattenepithelkarzinome zeigten in dieser Arbeit 70 % der untersuchten Präparate eine stärkere bzw. die gleiche Signalintensität im Vergleich zum jeweils korrespondierenden Normalgewebe. In diesem Fall könnte der OXR1 als Zielstruktur für eine gerichtete Individual-Therapie oder -Diagnostik angewendet werden. Hierzu wurden die Klassifizierungsdaten der Tumore im Vergleich zur OXR1-Expression herangezogen. Es konnte jedoch keine Übereinstimmung zwischen der Expressionsdichte (Signalstärke der IHC-Färbung) mit Metastasierung (N), Differenzierungsstadium (G) oder Tumorinvasion (T) korreliert werden. Die Expression des OXR1 wurde in 44 % der Adenokarzinome des Ösophagus als höher im Vergleich zum Normalgewebe beurteilt. Auch bei diesen Karzinomen konnte keine Korrelation zwischen OXR1-Expression und TNM-Klassifizierung nachgewiesen werden. Es muss hier jedoch erwähnt werden, dass die Stichprobenmenge keine signifikanten Schlüsse zulässt.

Die Charakterisierung der OXR1 positiven Tumorzellen mit dem epithelialen Tumormarker CK19 und dem Bindegewebsmarker Vimentin zeigten ein identisches Färbemuster von OXR1 und CK19 in den Tumorzellen des Plattenepithelkarzinoms. CK19 wird für die Charakterisierung der epithelialen Histogenese einer Vielzahl an unterschiedlichen Karzinomen herangezogen. Dieses Intermediärfilament ist auch in 86 % des ösophagealen Normalgewebes speziell im Plattenepithel zu finden (Loke & Shen, 1995). Dies deutet an, dass der OXR1 während der Entartung der gesunden Zellen zu Tumorzellen weiter exprimiert wurde und dies wie oben beschrieben in 70 % der hier untersuchten Tumoren in einer höheren oder gleichen Dichte im Vergleich zu den gesunden Zellen des Plattenepithels. Die Verfügbarkeit einer Zielstruktur während der Entartung der gesunden Zellen zu Tumorzellen und während der weiteren Dedifferenzierung der Tumorzellen ist eine Voraussetzung zur Eignung der Struktur als Tumormarker. Dies gewährleistet die Detektion von gut differenzierten (G1) bis hin zu wenig differenzierten (G3) Tumorzellen. Ein weiterer Hinweis auf Erhaltung der Zielstruktur erbrachte die Detektion des OXR1 auf RNA und Proteinebene in ca. 70 % der humanen ösophagealen Tumorzelllinien.

Die Ergebnisse der Tumorfärbungen und Tumorzelllinien sprachen für die Eignung des OXR1 als Zielstruktur einer gerichteten Tumordiagnostik und -therapie in den Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus. Dementgegen stand die Expression der Zielstruktur im normalen Plattenepithel des Ösophagus. Ob sich eine Zielstruktur als Tumortarget eignet, muss in ersten Schritten am Tiermodell gezeigt und untersucht werden. Hierzu wurde die endogene OXR1-Expression verschiedener Tumorzelllinien genutzt, um den OXR1 als Zielstruktur für eine gerichtete Tumordiagnostik im Tiermodell weiter zu verifizieren. Zunächst musste die Frage beantwortet werden, ob die Zielstruktur in einem subkutanen Tumormodell erhalten bleibt. Die dafür gefärbten Xenograft-Tumore wiesen eine Färbung einzelner bzw. aller humaner Tumorzellen der mit Kyse180, OE33, HT-29, Kyse410 MiaPaca2 und im mit BxPc3-Zellen generierten Tumor nach. Im Vergleich war der Anteil der gefärbten Zellen in den Kyse180-Zellen im Xenograft am höchsten und die Färbung am intensivsten. Aufgrund der fast identischen Aminosäuresequenz erkennt der OXR1-Antikörper den murinen und humanen OXR1, was dazu führt dass in diesen Färbungen nicht unterschieden werden kann zwischen dem OXR1 der Tumorzelllinien und dem umliegendem murinenem Gewebe und murinem vaskulären Strukturen.

Nachdem die Erhaltung der OXR1-Expression in den meisten Tumorzelllinien im subkutanen Tumormodell nachgewiesen werden konnte, wurde der Einsatz des fluoreszenzmarkierten OXA an drei unterschiedlichen Tumorentitäten im Tiermodell untersucht.

Eine NIFR-Bildgebung mit dem OXA-IDCC konnte in einem subkutanen Kyse180-Tumor und einem orthotopen HT-29-Tumor erfolgreich durchgeführt werden. Im Großteil der Versuche war eine Detektion des Tumors jedoch nicht erfolgreich. Darüber hinaus konnten die Tumore nur ein bis zwei Stunden nach OXA-IDCC-Injektion mittels der NIFR-Bildgebung detektiert werden.

Dies könnte zum einen auf eine schnelle Prozessierung und damit eine geringe Halbwertszeit des nativen OXA zurückzuführen sein oder auf eine einfache Anreicherung des OXA-IDCC im Tumor aufgrund der vermehrten vaskulären Strukturen im Tumor. Die Plasma-Halbwertszeit von OXA in der Ratte liegt bei $27,1 \pm 9,5$ min (Ehrstrom, 2004). Dies ist verglichen mit anderen Peptiden im Darm relativ hoch, für die Anwendung in der Tumorbildgebung jedoch zu kurz. Die Halbwertszeit von in der Klinik benutzten Peptidanaloga zur Diagnostik von NETs, Octreotid, beträgt 1,5 bis 2 h (Janecka et al., 2001; Weiner & Thakur, 2002). Die Konzentration der Fluoreszenz in der Leber, den Nieren und der Blase zeigte einen typischen Verlauf einer peptidbasierten Bildgebung für OXA-IDCC. Die Konzentration der Fluoreszenz in der Blase nach 10 min zeigte nach einer Stunde ihr Maximum, wobei der restliche Körper eine Fluoreszenz vergleichbar mit der vorher gemessenen Autofluoreszenz (pre) aufwies (Abb. 40). Diese schnelle Auswaschung („clearance“) des fluoreszenzmarkierten OXA weist auf keine Bindung des OXA in anderen Geweben hin. Dies könnte für die Eignung dieses Peptids als Leitstruktur hinweisen, da keine gesunden Gewebe durch das Peptid erkannt werden und somit die Hintergrundfluoreszenz minimiert wird (Ehrstrom, 2004). Natürlich führt die geringe Stabilität genauso im Normalgewebe zu einem schnellen Abbau des Peptids, es konnte aber keine Bindung des OXA-IDCC innerhalb der ersten zwei Stunden nach Applikation detektiert werden.

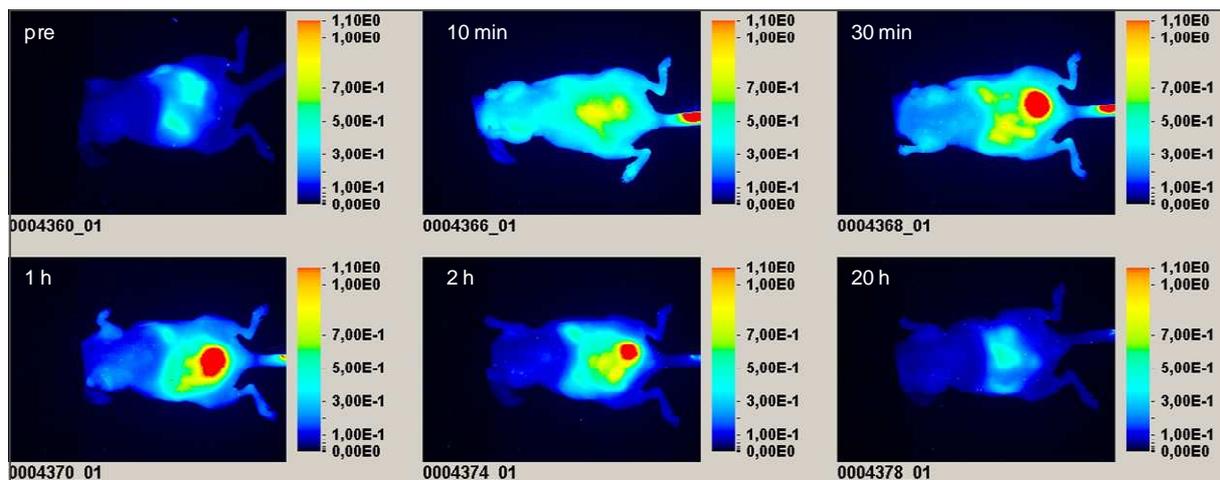


Abb. 40: Fluoreszenzbildgebung einer HT-29-Tumor tragenden Nacktmaus. Ventrale Ansicht. *In vivo* Fluoreszenzbildgebung nach i.v. Applikation von OXA-IDCC (1 nmol/kg). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Petra Schulz und Cordula Dierkes.

Weiterführende Untersuchungen müssen sich auf die Optimierung der Peptidsequenz des humanen OXA konzentrieren, um eine mögliche verkürzte und stabilere Variante mit gleichen Bindungseigenschaften zu entwickeln. Es gibt mehrere Arbeitsgruppen, die sich mit der Verkürzung des OXA beschäftigt haben, jedoch wurden in keiner der Arbeiten die Halbwertszeiten dieser verkürzten Peptid-Analoga bestimmt (Ammoun et al., 2003; Darker et al., 2001; Lang et al., 2006, 2004; Okumura et al., 2001; Roecker & Coleman, 2008a; Smart et al., 2001). Zur Behandlung von neuronal bedingten Schlafstörungen (Narkolepsie, Insomnie) wurden „small molecules“ entwickelt, wie z.B. Almorexant, die eine antagonistische Wirkung auf den OXR1 und OXR2 haben und so die

Symptome abschwächen. Einige Antagonisten sind in klinischen Phase II und III Studien oder werden schon zur Behandlung eingesetzt (Coleman & Renger, 2010; Coleman et al., 2011; Roecker & Coleman, 2008b; Scammell & Winrow, 2011). Sie haben den Vorteil einer langen Halbwertszeit im humanen Plasma von 6 bis 19 h (Roecker & Coleman, 2008b). Es wäre denkbar, diese „*small molecules*“ nach Kopplung mit NIR-Farbstoffen für eine gerichtete Tumordiagnostik zu nutzen. Bei dieser Anwendung ist die Fähigkeit der „*small molecules*“, die Blut-Hirn-Schranke zu durchqueren (Roecker & Coleman, 2008b) und periphere Wirkungen als Medikamente zu entfalten zu bedenken. Ein für den OXR1 selektiver Antagonist ist der SB-334867 (Putula & Kukkonen, 2011; Smart et al., 2001), der eine Bindung und somit eine Diagnostik, nach Kopplung mit einem signalgebenden Agens, ausschließlich der OXR1-Zielstruktur gewährleisten würde. Dieser wurde jedoch auch noch nicht auf seine Halbwertszeit im Plasma untersucht und birgt als Antagonist die gleichen Risiken der OXR1-Beeinflussung in der Peripherie wie oben beschrieben. Es gibt mehrere Beispiele in denen „*small molecules*“ für eine gerichtete Tumordiagnostik eingesetzt werden. In solchen Fällen müssen vorab die Bindungseigenschaften nach Kopplung eines signalgebenden Agens und auch die Kreuzaktivitäten mit anderen Rezeptoren getestet werden, bevor diese als Leitstruktur für eine gerichtete Tumordiagnostik eingesetzt werden können.

Die Expressionsanalyse der Gewebe sowie der humanen Tumorzelllinien weist auf ein Potenzial des OXR1 als Zielstruktur für eine gerichtete Tumordiagnose und -therapie in Ösophaguskarzinomen, kolorektalen Karzinomen und pankreatischen Karzinomen hin. Die semi-quantitative Auswertung der Ösophagustumore in Verbindung mit der Erhaltung der Zielstruktur während der Dedifferenzierung der Tumorzellen und im subkutanen Tumormodell zeigte im besonderem die Eignung der Zielstruktur als Tumortarget für eine Individualtherapie in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus. Um diese Frage abschließend zu klären, sollte eine NIFR-Bildgebung mit einer stabileren OXA-Variante durchgeführt werden.

4.3 OXR1-vermittelte Effekte

Die Validierung der Expression des OXR1 in humanen Tumorgeweben und Tumorzellen führte zu weiteren Fragen nach der Funktion des Rezeptors in den Tumorzellen. Welchen Nutzen ziehen die Tumorzellen aus der Expression dieses Rezeptors? Gibt es einen Einfluss der OXR1-Aktivierung auf das Tumorstadium, Angiogenese oder auf andere Tumorbildung begünstigende Faktoren. Die Expression des OXR1 in den Tumorzelllinien lieferte geeignete Modelle zur Untersuchung der OXR1-vermittelten Effekten nach Ligandenaktivierung.

4.3.1 Zelluläre Effekte

Die Untersuchung zellulärer Liganden-Effekte, im speziellen des Einflusses des nativen Liganden auf die Proliferation, Apoptose und Zellzyklus von humanen Tumorzelllinien, zeigte keine Beeinflussung der OXR1-Aktivierung. Es konnte keine Änderung der Wachstumsraten nach OXA-Applikation auf die ösophagealen Tumorzelllinien und die kolorektale HT-29-Tumorzelllinie nachgewiesen werden. Aus der Literatur geht hervor, dass mehrfach eine proliferierende Wirkung von OX vermittelt über den OXR1 in nativen Zelllinien gezeigt werden konnte (Ito et al., 2008; Malendowicz et al., 2001; Spinazzi, et al., 2005; Zwirski-Korczała et al., 2007). Die proliferierende Wirkung der OX wurde größtenteils in Nierenzellen, Nebennieren und Nebennierenadenomen beschrieben, was darauf hinweist, dass dies eine physiologische Funktion im Bereich der Niere für OX darstellt. So konnte eine proliferierende Wirkung von OXA und OXB auf das Tumorstadium in humanen Nebennierenadenomen beobachtet werden (Spinazzi, et al., 2005).

Dem entgegengesetzt gibt es einige Hinweise aus der Literatur, dass OX einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation haben (Ziolkowska & Rucinski, 2008). Zwei unabhängige Arbeitsgruppen zeigten eine OXA-vermittelte Apoptose in transfizierten Systemen und nativen kolorektalen Tumorzelllinien (Ammoun et al., 2006; Laburthe et al., 2010; Rouet-Benzineb et al., 2004; Voisin, 2006; Voisin et al., 2011, 2008). In dieser Arbeit konnte jedoch kein Apoptose induzierender Effekt von OXA und OXB im überexprimierten System und auch nicht in den kolorektalen HT-29-Zellen nachgewiesen werden. Demnach konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden. Diese Differenz könnte mit dem unterschiedlichen Methodenspektrum zur Untersuchung der Apoptose erklärt werden. Die Gruppe um Voisin zeigte Apoptoseinduktion nach 48 h aufgrund von Annexin-V-Färbung und Caspase-Aktivierung. Beides sind frühe Merkmale der Apoptose. In dieser Arbeit wurde die DNA-Fragmentation, das letzte Merkmal der Apoptose, benutzt, um nach 48 h apoptotische Zellen zu detektieren. Des Weiteren kann durch Mutation und Selektion das Transkriptom der HT-29 Zellen verändert werden, was zu anderen zellulären Effekten der gleichen Zelllinie in verschiedenen Laboren führen kann. Es konnte jedoch bestätigt werden, dass die Aktivierung des OXR1 keinen Einfluss auf den Zellzyklus zeigt (Ammoun et al., 2006; Rouet-Benzineb et al., 2004).

4.3.2 Signaltransduktion

Nachdem in den nativen Zelllinien keine Funktion auf die Apoptose und Proliferation von OXA detektierbar war, sollte die Frage nach der OXR1-vermittelten Signaltransduktion in diesen Zelllinien beantwortet werden. Wie in der Einleitung beschrieben, werden zwei mögliche Signalwege nach GPCR-Aktivierung unterschieden: der Arrestin-abhängige und der G-Protein-abhängige Signalweg (1.1.2). Es sind auch Liganden bekannt, die entweder nur G-Protein- oder nur Arrestin-vermittelte zelluläre Reaktionen auslösen, sogenannte „bias“-Agonisten (Whalen et al., 2011). Die funktionelle Charakterisierung einer Rezeptor-Liganden-Bindung sollte deshalb immer unterschiedliche Effektorsignale betrachten. Der G-Protein-abhängige Signalweg wurde in dieser Arbeit mit der Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung, welches aus der Kopplung über die $\text{G}\alpha_q$ -Proteine resultiert, und mit der Detektion des intrazellulären cAMP-Spiegels, der über die $\text{G}\alpha_s$ - und $\text{G}\alpha_i$ -Proteine indirekt beeinflusst wird, untersucht. OXR interagieren mit allen drei G-Protein-Familien, $\text{G}\alpha_s$, $\text{G}\alpha_i$ und $\text{G}\alpha_q$ (Holmqvist et al., 2005; Karteris et al., 2005; Randeva, 2001), was eine erhebliche Vielseitigkeit der OXR-Signalwege andeutet (Ammoun et al., 2006).

Alle funktionellen Versuche wurden in Bezug auf den stabilen OXR1-Klon durchgeführt. Der stabile OXR1-Klon wurde zunächst auf die in der Literatur meist beschriebene $\text{G}\alpha_q$ -Kopplung in rekombinanten Systemen, die zu einem Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg führt, untersucht. Die Applikation von OXA induzierte im OXR1-Klon einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} im Vergleich zur Hek293a-Ursprungszelllinie mit einer EC_{50} von 13 nM. Dies bestätigen die in der Literatur beschriebenen EC_{50} -Werte (Ammoun et al., 2003; Darker et al., 2001; Holmqvist et al., 2005; Lang et al., 2006, 2004; Okumura et al., 2001). Es konnten in rekombinanten CHO-Zellen EC_{50} -Werte von 10 nM (Darker et al., 2001; Holmqvist et al., 2005) in OXR1 stabil transfizierten Hek293a-Zellen EC_{50} -Werte von 90 bis 240 nM (Lang et al., 2006, 2004) ermittelt werden. Die funktionelle Aktivität auf die Ca^{2+} -Mobilisierung des nativen zyklischen OXA (zyOXA) und des linearen (Disulfidbrücken reduzierten) OXA (linOXA) wurde im OXR1-Klon verglichen, um herauszufinden, mit welchem OXA die funktionellen Versuche weitergeführt werden sollten. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Werte kaum unterschieden. Das zyOXA zeigte eine gering höhere Aktivität auf die Kalziummobilisierung in dem OXR1-Klon im Vergleich zum linOXA. Dies bestätigte wiederum die Literatur, in der gezeigt werden konnte, dass die Reduzierung der Disulfidbrücken keinen großen Einfluss auf die funktionelle Potenz zeigten. Jedoch konnten Lang und Okumura unabhängig voneinander zeigen, dass die EC_{50} um den Faktor 10 erhöht wurde, wenn die Cysteine ausgetauscht wurden (Lang et al., 2006, 2004; Okumura et al., 2001). Eine 60- bis 20-fache Erniedrigung der funktionellen Aktivität zeigte das verkürzte OXA (15-33), wenn also die Bereiche der Disulfidbrückenbildung ganz weggelassen wurden (Ammoun et al., 2003; Darker et al., 2001; Lang et al., 2006, 2004; Okumura et al., 2001). Um eine Beeinflussung der funktionellen Aktivität des OXA durch die Markierung mit IDCC ausschließen zu können, wurden die OXA-IDCC-Peptide auf eine

veränderte Ca^{2+} -Mobilisierung im OXR1-Klon untersucht. Hier zeigten sich minimale Unterschiede in der Aktivität. Die Markierung der OX mit IDCC minimierte die Aktivität des zyOXA um das 1,8-fache und die linOXA-Aktivität um das 4,6-fache, wobei die erzielten EC_{50} -Werte von 23 nM und 88 nM noch immer in dem von der Literatur beschriebenen Wertebereich lagen (Ammoun et al., 2003; Darker et al., 2001; Holmqvist et al., 2005; Lang et al., 2006, 2004; Okumura et al., 2001). Um dennoch die höchst mögliche funktionelle Aktivierung zu zeigen und die evtl. nicht physiologischen Eigenschaften des linOXA auszugrenzen, wurden für die funktionellen Versuche in dieser Arbeit das zyOXA bzw. das zyOXA-IDCC benutzt.

Die untersuchten nativen ösophagealen Zelllinien zeigten keine Ca^{2+} -Mobilisierung nach OXA-Applikation. Dies weist darauf hin, dass der Rezeptor in diesen Zelllinien nicht über $\text{G}\alpha_q$ an den IP_3 -Signalweg gekoppelt ist. Die Positivkontrolle (grün) bestätigte den Erfolg der Versuche und die Nutzbarkeit dieser Methode zur Detektion der Veränderung der Kalziumkonzentration in den Zellsystemen. Der OXR1-Klon und die HT-29-Zellen zeigten einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach OXA-Gabe was eine $\text{G}\alpha_q$ -Kopplung des Rezeptors in diesen Zelllinien an den IP_3 -Signalweg nachwies. In der Literatur wurde die Erhöhung des Kalziumspiegels nach OXA-Applikation bisher in allen OXR1 überexprimierten Systemen beschrieben (Ammoun et al., 2006; Holmqvist et al., 2001; Lund et al., 2000; Okumura et al., 2001; Sakurai, Amemiya, et al., 1998; Smart et al., 1999). Der Anstieg der Kalziumkonzentration nach OXA-Applikation in HT-29-Zellen und auch ösophagealen Tumorzelllinien war bisher noch nicht Gegenstand publizierter Untersuchungen.

Da aus der Literatur hervorgeht, dass die Kopplung des OXR1 an alle drei verschiedenen G-Protein-Familien möglich ist, wurde dieser Möglichkeit mit einem cAMP Assay nachgegangen. Änderungen der cAMP-Konzentration werden durch verschiedene Isoformen der Adenylylzyklase (AC) reguliert. Diese kann über $\text{G}\alpha_s$ aktiviert und über $\text{G}\alpha_i$ inhibiert werden (Marinissen & Gutkind, 2001; Oldham & Hamm, 2006). Mit diesem cAMP Assay war es möglich, eine inhibitorische Wirkung vermittelt über $\text{G}\alpha_i$ und eine stimulierende Wirkung über $\text{G}\alpha_s$ des aktivierten OXR1 zu detektieren. Die Applikation von Forskolin führt zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration. Forskolin ist ein nichtselektiver Aktivator fast aller humaner Adenylylzyklasen (AC) (Dessauer et al., 1999), und galt daher als Positivkontrolle.

Die Integrität des AC-Systems wurde mit Forskolin in allen untersuchten Zelllinien positiv getestet. Die geringe aber signifikante Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels nach OXA-Applikation in Kyse180 und Kyse140 wies eine $\text{G}\alpha_s$ -Kopplung des Rezeptors in diesen Zellen nach. Dieser cAMP-Anstieg war nur im Fall der Kyse180-Zelllinie konzentrationsabhängig und signifikant erhöht bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 500 nM OXA. Dies steht im Einklang mit publizierten Daten, die eine über den nativen OXR1 vermittelte EC_{50} von 680 nM auf die Erhöhung

des cAMP-Spiegels in der Primärzellkultur von Ratten-Astrozyten bestimmen konnten (Woldan-Tambor et al., 2011).

Der OXR1-Klon zeigte nach OXA-Applikation keine Beeinflussung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Dies bestätigt schon publizierte Untersuchungen, in denen kein Effekt auf die cAMP-Produktion nach OXA-Applikation in OXR1 transfizierten Hek293-Zellen ermittelt werden konnte (Chen & Randeva, 2004). Mit einer hohen EC_{50} von 300 nM konnte jedoch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in OXR1 rekombinanten CHO-Zellen gezeigt werden (Holmqvist et al., 2005). Der Effekt auf den intrazellulären cAMP-Spiegel beruht auf dem Expressionsprofil der AC-Isoformen und anderen regulierend in die Enzymaktivität eingreifenden Proteinen in den Zellen. Somit kann ein anderer Zellhintergrund die Signaltransduktion maßgeblich verändern (Kamenetsky et al., 2006; Sadana & Dessauer, 2009; Woldan-Tambor et al., 2011). Es sind neun Isoformen der Mammalia Adenylylzyklasen (AC) bekannt, die in unterschiedliche Signalwege regulierend eingreifen.

Die Kyse140-Zellen zeigten bei 50 nM einen intrazellulären cAMP-Anstieg, jedoch nicht bei 500 nM. Dies weist auf eine indirekte Beeinflussung des cAMP-Spiegels hin. Außerdem konnte im Falle der Kyse140-Zellen ein gegenteiliger Effekt bei der Untersuchung der Reduzierung des intrazellulären cAMP-Spiegels nachgewiesen werden. Dabei wurde der cAMP-Spiegel mit der Applikation von OXA nach Forskolin-Stimulation der Zellen noch weiter erhöht. Dies kann passieren, wenn die Aktivierung des OXR1 zu einer Stabilisierung des gebildeten cAMP führt, welches normalerweise durch spezifische Phosphodiesterasen (PDE) abgebaut wird. Werden diese blockiert, kann die Halbwertszeit von cAMP erhöht werden, was wiederum den Effekt einer Erhöhung des cAMP-Spiegels hat. Mit der quantitativen Echtzeit-PCR -Analyse konnte ich die Expression des OXR2 in den Kyse140-Zelllinien nachweisen (Daten nicht gezeigt), dies könnte eine Erklärung sein für eine indirekte Beeinflussung des cAMP-Spiegels, vermittelt über den OXR2 in den Kyse140-Zellen.

Eine Reduktion des cAMP-Spiegels wurde zunächst bei einer Standardkonzentration von 5 μ M Forskolin untersucht. Dabei zeigten sich die OE33- und OE21-Zelllinien als potentiell interessant und wurden weiter bei einer EC_{80} von Forskolin untersucht, um auch minimale Effekte besser detektieren zu können. Bei der anschließenden konzentrationsabhängigen Untersuchung auf die cAMP-Reduktion konnte jedoch kein Effekt in den OE21-Zellen bestätigt werden. Die OE33-Zellen hingegen zeigten bei 5 μ M eine signifikante Erniedrigung der cAMP-Konzentration (Abb. 32), wobei dieser Effekt bei einer EC_{80} von Forskolin wieder verloren ging. Es gibt Untersuchungen, die einen dualen Effekt der OXR1-Aktivierung gezeigt haben, dabei zeigte sich eine schwache basale Reduzierung von cAMP mit einer hohen Potenz (EC_{50} 1 nM), die bei höheren Konzentrationen überlagert wurde durch die starke Erhöhung des cAMP-Spiegels mit niedrigeren Potenzen (EC_{50} von 300 nM) (Holmqvist et al., 2005).

Die funktionelle Charakterisierung der OXA-OXR1-Bindung in den Tumorzelllinien wurde weiter auf β -Arrestin-vermittelte Effektorsignale untersucht. Hierzu wurde die Veränderung des Zytoskeletts aufgrund von Rezeptor-Peptid-Bindung und der anschließenden Signaltransduktion mit der BIND®-Technologie (Biomolekulare-Interaktions-Detektion) untersucht. Da die Aktivierung von

GPCRs aktinabhängige Änderungen in der zellulären Morphologie induziert, kann diese Technologie zur Charakterisierung und Quantifizierung von zellulären Signalen, die durch GPCRs aktiviert werden, herangezogen werden (Peters & Scott, 2009). In diesen Untersuchungen konnte nur eine minimale Änderung der Morphologie in dem OXR1-Klon ermittelt werden, wobei dieser nicht signifikant war. Anhand der Messungen mit dem stabilen OXR1-Klon konnte daher gezeigt werden, dass das BIND-System kein geeignetes System zur Detektion des OXR1-OXA-Bindung und der folgenden Signaltransduktion darstellt. Der Einfluss des aktivierten OXR1 auf das Zytoskelett scheint nach Aktivierung sehr gering zu sein.

Die Internalisierungsversuche zeigten eine spezifische Bindung des OXA-IDCC, die mit dem unmarkierten OXA verdrängt werden konnte. Die transient mit OXR1 transfizierten Hek293a-Zellen wiesen eine starke Fluoreszenz an der Plasmamembran und eine teilweise internalisierte Fluoreszenz in den Zellen auf. Im Gegensatz zu dem stabilen OXR1-Klon, der nach 30-minütiger Inkubation mit dem OXA-IDCC eine vollständige Internalisierung des Peptids zeigte. In den WT-Hek293a-Zellen ist keine spezifische Bindung des OXA-IDCC zu erkennen. Obwohl hier nur die Internalisierung des Peptids detektierbar war, ist davon auszugehen, dass dies die Desensibilisierung des OXR1 anzeigt und hier eine Internalisierung des OXR1-Peptid-Komplexes ausgelöst wurde. Diese Desensibilisierung scheint in transient transfizierten Zellen anderen Regulationsmechanismen unterlegen zu sein als die im stabilen OXR1-Klon. Die Intensität der Fluoreszenz war in den OXR1 transient transfizierten Zellen höher als im OXR1-Klon, was auf eine höhere Dichte an Rezeptoren zurückzuführen ist; dies ist bei einer transienten Transfektion auch zu erwarten. Im OXR1-Klon hingegen war die Fluoreszenzintensität geringer, hier zeigte sich eine vollständige Internalisierung des OXA-IDCC in intrazellulären Endosomen. Die Fähigkeit des OXR1 zu internalisieren wurde schon in mehreren Arbeiten gezeigt (Ellis et al., 2006; Milasta et al., 2005; Ward et al., 2011b). Dabei konnte die Interaktion C-terminaler AS des OXR1 mit β -Arrestin 1 und 2 und eine dadurch vermittelte ERK-Aktivierung in heterologen Zellen nachgewiesen werden (Dalrymple et al., 2011; Sandra Milasta et al., 2005). Die Interaktion der Arrestine mit den durch GRKs phosphorylierten OXR1-Rezeptoren führt zu einem Einschleusen des Komplexes in einen schnellen Recyclingweg und somit zu einer Resensibilisierung der Rezeptoren an der Plasmamembran, was für einen Klasse-A-Rezeptor typisch ist (Dalrymple et al., 2011; Oakley et al., 1999; Verkaar et al., 2008). Die Interaktion der Klasse-B-Rezeptoren führt aufgrund von stabileren Bindungen des Rezeptorkomplexes mit den Arrestinen zu einer langsameren Resensibilisierung. Dies konnte für den OXR2-Rezeptor gezeigt werden (Dalrymple et al., 2011). Die minimale intrazelluläre Fluoreszenz in den nativen untersuchten Zelllinien konnte in allen Zelllinien nicht mittels des OXA verdrängt werden. Außerdem war die Fluoreszenz bzw. die Sensitivität der angewandten Methode zu gering, um diese Präparate auswerten zu können. Bisher konnte jedoch keine Internalisierung des OXR1 bzw. dessen Liganden in nativen Zelllinien gezeigt werden.

Aufgrund der fehlenden Sensibilität zur Detektion des IDCC im LSM wurde die Detektion des OXA-IDCCs im Durchflusszytometer untersucht. Hierzu wurde ein Vorversuch durchgeführt, der nicht in den Ergebnisteil dieser Arbeit mit einbezogen wurde. Der Vorversuch sollte die Eignung der angewendeten Methode zur Detektion einer Internalisierung des OXA-IDCC zeigen (Abb. 41). Der stabile OXR1-Klon, OXR1 transient transfizierte Hek293a-Zellen, Hek293a-WT-Zellen, HT-29- und Kyse180-Zellen wurden für 30 min mit dem OXA-IDCC inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen (*wash*), und die Ligandenlösung wurde durch Durchflusszytometriepuffer ohne Liganden ersetzt. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde durchflusszytometrisch an verschiedenen Zeitpunkten über fünf Stunden bestimmt (Abb. 41). Die Ergebnisse bestätigten die schon in der IF festgestellten Beobachtungen. Die OXR1 transient transfizierten Zellen zeigten die stärkste MFI im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zellen. Betrachtet man den 30-min-Wert, war die MFI des stabilen OXR1-Klons dreifach niedriger im Vergleich zur transienten Transfektion, was die Beobachtungen der IF bestätigte. Die nochmals um die Hälfte geringere Fluoreszenzintensität der Kyse180- und HT-29-Zellen war mit dem Durchflusszytometer aber nicht mittels der IF detektierbar.

Die Abnahme der MFI nach Entfernen des OXA-IDCC (*wash*) in den Kyse180-, HT-29-Zellen und dem OXR1-Klon, wies auf eine Rezeptor-Peptid-Bindung und anschließende Internalisierung des Rezeptor-Peptid-Komplexes in Endosomen hin, wo das Peptid über die Zeit abgebaut wird (Becker et al., 2001). Keine Abnahme der MFI über die Zeit wurde in OXR1 transient transfizierten Zellen detektiert, was ein verändertes Internalisierungsverhalten, welches in der IF schon beobachtet wurde, durchflusszytometrisch bestätigte. Die WT-Hek293a-Zellen zeigten dem gegenüber einen sehr geringen Anstieg der Fluoreszenzintensität und keine Abnahme dieser über die Zeit.

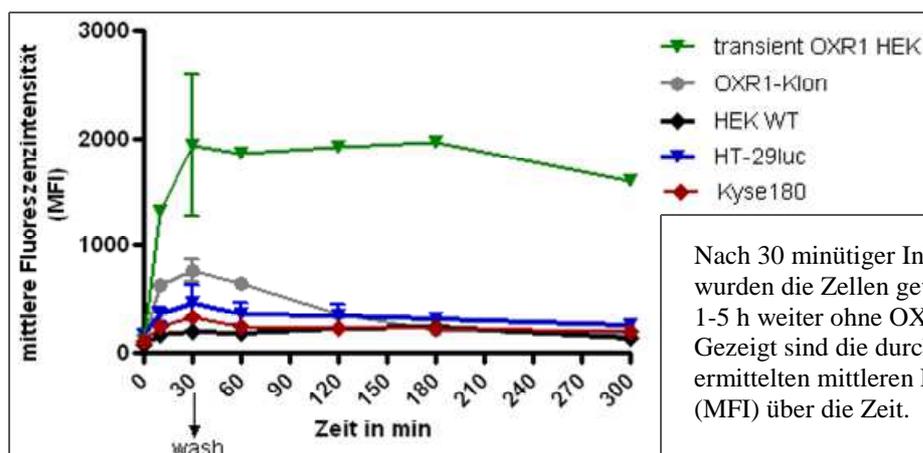


Abb. 41:
Internalisierung und zelluläre Verweildauer des OXA-IDCC über 5 h im Durchflusszytometer.

Nach 30 minütiger Inkubation mit OXA-IDCC wurden die Zellen gewaschen (*wash*) und für 1-5 h weiter ohne OXA-IDCC inkubiert. Gezeigt sind die durchflusszytometrisch ermittelten mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) über die Zeit.

Dieses fluoreszenzmarkierte OXA wurde daraufhin weiter in durchflusszytometrischen Analysen benutzt, um die Aufnahme des OXA-IDCC und somit β -Arrestin-vermittelte Signaltransduktion des Rezeptors nachzuweisen und den Anteil an OXA-IDCC internalisierenden Zellen (IDCC positive Zellen) in der Gesamtpopulation zu ermitteln. Wie schon in der Kinetik-Analyse (Abb. 41) konnten eine um die 20-fache Erhöhung der MFI im Vergleich zum freien Farbstoff und ein 10-facher Anstieg der MFI in dem OXR1-Klon ermittelt werden. Dieser Anstieg konnte mit dem unmarkierten OXA und

auch mit dem selektiven OXR1-Antagonisten SB-33748 aufgehoben werden, was eine spezifische Bindung des OXA-IDCC an den OXR1 und eine gerichtete Internalisierung in diesen Zellen zeigte. Damit war die OXR1-vermittelte Internalisierung des OXA-IDCC im OXR1-Klon und transient transfizierten Zellen bewiesen. Parallel dazu konnten 30 % der Zellen der transient OXR1 transfizierten Zellen und 84 % der Zellen des OXR1-Klons als IDCC positiv detektiert und somit als OXA-IDCC internalisierende Zellen ausfindig gemacht werden (Tab. 9). Die überwiegende Anzahl der Ösophagus-Tumorzelllinien zeigten weniger als 5 % IDCC positive Zellen. Die Ausnahme stellen die OE19-Zellen dar, die keinen Anstieg der MFI nach OXA-IDCC-Inkubation zeigten und somit negativ für den OXR1 waren, was mit der quantitativen Echtzeit-PCR und mit der IF bestätigt wurde. Der geringe Anteil an IDCC positiven Zellen, der nicht mit dem SB-33478 inhibierbar war, weist auf eine OXR1 unabhängige Internalisierung in den Tumorzelllinien hin. Neben der Clathrin-abhängigen Internalisierung existiert auch eine G-Protein- und Clathrin-unabhängige Internalisierung, die zu einer constitutiven Internalisierung des beta2 adrenergen und des M3 muscarinic Rezeptors führt, die nicht mittels Antagonisten blockierbar ist (Scarselli & Donaldson, 2009). Die MiaPaca2- und HT-29-Zellen zeigten den höchsten Anteil an IDCC positiven Zellen (78 % und 6 %) nativer Tumorzelllinien, wobei sich die Reaktion zum größten Teil nur mit OXA und nur zu einem kleinen Teil mit dem OXR1 selektiven Antagonisten verdrängen ließ (Tab. 9). Dies könnte auf die Anwesenheit eines anderen Rezeptor-Subtyps in diesen Zellen hinweisen, der zu einer nicht vollständigen Verdrängung der Reaktion führt. Es konnte jedoch in diesen beiden Zelllinien keine Expression des OXR2 nachgewiesen werden. Weiter kann spekuliert werden, dass der SB-33478 an anderen Epitopen bindet als das OXA-IDCC und somit die Bindung und Internalisierung nicht vollständig verhindert wird. Zusammenfassend kann hier gezeigt werden, dass nur ein geringer Teil der ösophagealen Tumorzelllinien OXA-IDCC internalisiert. Trotz einer hohen Sensitivität des Durchflußzytometers kann der geringe Anteil an OXA-IDCC positiven Tumorzellen auch ein Ergebnis zu geriner Sensivität sein. Sind auf jeder Zelle nur wenige Rezeptoren exprimiert ist, das Fluoreszenzsignal (MFI) nur sehr gering erhöht, wohingegen eine Erhöhung des MFI auf eine erhöhte Rezeptordichte schließen lässt. Es könnte also durchaus sein, dass die Tumorzelllinien nur eine geringe OXR1-Dichte aufweisen, wobei jedoch alle Rezeptoren mit dem OXA-IDCC internalisieren. Einen größeren Anteil an OXA-IDCC positiven Zellen zeigten die MiaPaca2- und HT-29-Zellen. Im Hinblick auf die *in vivo* Versuche war dies mit ein Grund für die Durchführung einer NIFR-Bildgebung mit dem OXA-IDCC in MiaPaca2- und HT-29-Tumoren.

Auf der einen Seite erklärt eine geringe Anzahl an signalauslösenden Rezeptoren auch die negativen Ergebnisse der funktionellen Versuche, auf der anderen Seite wurde die Expression auf RNA- und Protein-Ebene in diesen Zelllinien nachgewiesen, wobei davon auszugehen ist, dass die Anwesenheit einer Struktur in biologischen Systemen meist mit einer daran gekoppelten Funktion verknüpft ist. Die Anzahl an Rezeptoren kann nur durch ein Bindungsassay bestimmt werden und ist unabhängig von einer Signaltransduktion.

Eine Möglichkeit der Erklärung für das Vorhandensein des OXR1 auf mRNA- und Proteinebene aber eine fehlende Signaltransduktion in den meisten Tumorzelllinien, wäre das Vorliegen von OXR1-Splicevarianten in diesen Zelllinien und womöglich auch Tumoren, die zwar das Epitop des Antikörpers beinhalten, aber keinen Signalweg aktivieren können und zusätzlich die Fähigkeit der Internalisierung verloren haben. Daneben könnten in den Zellen aber auch noch andere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Signalwege, durch OX aktiviert werden, z.B. die verschiedenen MAPK-Signalwege inklusive einer ERK Phosphorylierung (Ammoun et al., 2006; Hilairet et al., 2003; Spinazzi et al., 2005b; Ramanjaneya et al., 2009; Ramanjaneya et al., 2008; Wenzel et al., 2009; Milasta et al., 2005). Wobei die Aktivierung von ERK meist über G-Proteine vermittelt wird, von denen drei von vier Familien hier untersucht worden sind.

Weiter kann die Bildung von Di- und Oligomeren des OXR1 mit anderen Rezeptoren eine Rolle spielen. Sollte in diesen Zellen eine Di- und Oligomerenbildung zu einer Liganden unabhängigen Internalisierung führen, so würde dies zu einem konstitutiv aktiven Zustand des OXR1 führen, was die Erreichbarkeit der OXR1 an der Plasmamembran minimieren und somit eine geringe Liganden abhängige Internalisierung mittels des OXA-IDCC erklären würde. Es könnte die Bildung von Di- und Oligomeren des OXR1 mit dem CB1-Rezeptor nachgewiesen werden, was in einer Liganden-induzierten und Ligand-unabhängigen Internalisierung und Resensibilisierung resultierte. Hierbei konnte die ERK-Aktivierung über den OXR1 durch die Anwesenheit eines CB1-Antagonisten vermindert werden. Dies beweist die Beeinflussung des OXR1 durch andere Liganden, die nicht direkt an den Rezeptor binden (Ellis et al., 2006). Es konnte schon für mehrere GPCRs eine konstitutiv aktive Konformation nachgewiesen werden (Khilnani & Khilnani, 2011).

Die Internalisierung des OXR1 ist von besonderem Interesse, denn die Anreicherung des markierten Peptids in den Zellen kann zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis führen (Liu et al. 2005, Ginj et al. 2006, Reubi et al. 2010).

Eine Übersicht der Expression und der OXA-vermittelten Signalauslösung in den untersuchten Tumorzelllinien, welche als Funktionalität des OXR1 interpretiert wurden ist in Tab. 11 dargestellt. Zusammengefasst konnte keine zelluläre Funktion von OXA auf die untersuchten humanen Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Jedoch konnte im stabilen OXR1-Klon und den HT-29 Zellen eine $G\alpha_q$ -Kopplung des OXR1 an den IP_3 -Signalweg gezeigt werden und somit die Expression von funktionalen OXR1. In den Kyse180-Zellen konnte bei hohen OXA-Konzentrationen (500 nM) eine cAMP-Stimulierung gezeigt werden, die eine $G\alpha_s$ -Kopplung der funktionalen OXR1 in diesen Zellen anzeigte. Die gesteigerte cAMP-Produktion in den Kyse140-Zellen unterlag keiner OXA Konzentrationsabhängigkeit, was eine sekundäre Beeinflussung der cAMP-Stimulierung anzeigte und keine direkte Aktivierung über eine $G\alpha_s$ Kopplung. Dies bestätigte die additive Wirkung von OXA nach Forskolistimulation auf den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Eine OXA induzierte Reduzierung des cAMP-Spiegels bei hohen Forskolikonzentrationen konnte in den

OE33-Zellen nachgewiesen werden. Diese in den Kyse140- und OE33-Zellen beobachteten Effekte bedürfen weiterer Untersuchungen zur Charakterisierung OXA-vermittelter Signalwege in diesen Zellen. Die teilweise OXR1-vermittelte Internalisierung des OXA-IDCC in den HT-29- und MiaPaca2-Zellen lieferte einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein von funktionellen OXR1 in diesen Zellen. Ein sehr geringer Anteil der ösophagealen Zelllinien zeigte eine Internalisierung, der nur in den Kyse180-, 410- und OE33-Zellen zum Teil über funktionale OXR1 vermittelt war.

Tab. 11: Übersicht der Expression und Funktionalität des OXR1 in humanen Tumorzelllinien und dem OXR1-Klon. - OXR1 nicht detektiert bzw. keine Funktion; + OXR1 detektiert bzw. Funktion; nd: nicht durchgeführt, +↑ Erhöhung, +↓ Reduzierung.

Tumorentität	Zelllinie	Expression		Funktionalität			
		IF	TaqMan	BIND®	Ca ²⁺ -Mobilisierung	cAMP	OXR1-vermittelte Internalisierung
Ösophageales Adenokarzinom	OE19	-	-	-	-	-	-
	OE33	+	+	-	-	+↓	2 %
Ösophageales Plattenepithelkarzinom	OE21	+	nd	-	-	-	-
	Kyse140	+	+	-	-	+↑	-
	Kyse180	+	+	-	-	+↑	3 %
	Kyse410	+	+	-	-	-	4 %
	Kyse520	-	-	-	-	-	-
Kolorektales Karzinom	HT-29	+	+	-	+	-	6 %
Pankreatisches Karzinom	MiaPaca2	nd	+	nd	nd	nd	78 %
OXR1-Klon	HEK293a	+	+	-	+	-	85 %

5 Zusammenfassung

Eine frühe Diagnose mit einer daraus resultierenden rechtzeitigen Behandlung einer Krebserkrankung sind die entscheidenden Schritte für eine verbesserte Überlebensrate. Eine innovative Strategie stellt die zielgerichtete Tumordiagnose und -therapie dar. Dabei kommen tumorbindende Moleküle, die entweder an ein signalgebendes oder therapeutisches Agens gekoppelt werden können, zum Einsatz. Als Zielstrukturen solcher tumorbindenden Moleküle wurde in vorliegender Arbeit der Orexinrezeptor 1 (OXR1), ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR), auf die Eignung als Zielstruktur zur Behandlung von gastrointestinalen Tumoren hin untersucht. Weiter wurde die endogene Expression des OXR1 in humanen Tumorzelllinien nachgewiesen und OXR1-vermittelte Effekte untersucht.

In dieser Arbeit konnte das erste Mal an humanen Gewebeschnitten gezeigt werden, dass der humane OXR1 in 90 % der Ösophaguskarzinome, und in 86 % der pankreatischen Adenokarzinome und pankreatischen NETs stark exprimiert war. Darüber hinaus wurde der Rezeptor in 100 % der untersuchten kolorektalen Karzinome immunhistochemisch detektiert. Insbesondere in 93 % der untersuchten Plattenepithelkarzinome des Ösophagus wurde eine hohe OXR1 Dichte detektiert, wobei die Expression nicht mit dem Stadium der Tumorerkrankung der Patienten assoziiert war. Der OXR1 war ebenfalls im Plattenepithel des gesunden Ösophagus vorhanden, jedoch zeigte die semi-quantitative Auswertung der Gewebeschnitte, dass die Rezeptordichte in 70 % der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus höher oder mindestens gleich im Vergleich zum normalen Ösophagus war. Entsprechend wurde auf RNA und Proteinebene eine Expression des Rezeptors in humanen Tumorzelllinien (in 70 % der ösophagealen, in 70 % der kolorektalen, in 100 % der pankreatischen Tumorzelllinien) detektiert. Abschließend ließ der Nachweis des OXR1 in subkutanen *Xenograft*-Tumorschnitten auf die Erhaltung des Zielrezeptors im Mausmodell schließen. Diese Beobachtungen machen den OXR1 zu einem vielversprechenden Zielrezeptor für die gerichtete Tumordiagnostik und -therapie. Vorversuche der *in vivo* Bildgebung im Mausmodell mit NIR-gekoppeltem OXA waren nur in 20 % erfolgreich, was der geringen Stabilität des nativen OXA zu Grunde liegen könnte.

Funktionelle Untersuchungen der OXR1 endogen exprimierenden humanen Tumorzelllinien zeigten keinen Einfluss von OXA auf das Wachstums- oder Apoptoseverhalten der Zellen. Dies schließt die Einsetzung des OXA als wachstumshemmendes Therapeutikum aus, unterstützt jedoch die Anwendung als Leitstruktur für eine gerichtete Tumordiagnostik und -therapie. Die OXR-vermittelte Signaltransduktion wurde mittels der Ca^{2+} -Mobilisierung, cAMP Konzentrationsmessung und Internalisierungsversuchen untersucht, um die Funktionalität der Rezeptoren nachzuweisen. Hierbei konnten in einigen Tumorzelllinien unterschiedliche OXR1-induzierte Effektorsysteme nachgewiesen werden, welche auf die Funktionalität der OXR1 hinwiesen.

Zusammenfassend präsentieren die vorliegenden Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen und insbesondere der Expressionsanalysen den OXR1 als eine vielversprechende molekulare Zielstruktur für die gerichtete Tumordiagnostik und -therapie in Tumoren des GIT.

6 Summary

Early diagnosis and therapy are essential for improving the survival rate of cancer patients. One innovative strategy is demonstrated by targeted tumordiagnosis and -therapy. Here key structure binding molecules, which bind specifically to their target, are labeled either to a signal-producing or therapeutic agent. This work investigated the evaluation of the orexinreceptor 1 (OXR1), a G protein-coupled receptor (GPCRs), for the intended use as a target structure of gastrointestinal tumors. In addition human tumor cell lines, endogenously expressing OXR1, were identified to study OXR1-mediated effects.

This work demonstrated for the first time the expression of the OXR1 in 90% of the human esophageal tumor tissue samples and in 86% of the pancreas adenocarcinoma und pancreatic NETs which were investigated. Moreover in 100% of the colorectal carcinoma this receptor was detected by immunohistochemistry. Notably, 93% of the investigated esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) represented a high density of OXR1, while the OXR1 expression did not correlate with the tumor stage. The OXR1 expression was also found in normal esophageal tissue, however 70% of the esophageal squamous cell carcinoma showed a higher or equal expression profile in comparison to the normal tissue. Accordingly the receptor could be detected in human tumor cell lines (in 70% of the esophageal, in 70% of the colorectal and in 100% of the pancreatic tumor cell lines) on RNA and protein levels. Finally, the staining of subcutaneous *Xenograft*-tumor slices showed the availability of the maintaining structure in mouse model. These results demonstrate that OXR1 is a promising target for targeted tumordiagnosis and -therapy of ESCC and perhaps pancreatic and colorectal cancer. Preliminary results of *in vivo* imaging in mice using NIR-labeled OXA were successful only in 20 %, perhaps due to the low OXA stability.

Analyzing the OXR1-mediated effects in human tumor cell lines endogenously expressing the OXR1, no influence of OXA on proliferation and apoptosis could be detected. This excludes the use of OXA as anti-proliferative therapeutic. To show the functionality of the endogenously expressed receptor, OXR1-induced signaling was reviewed measuring Ca^{2+} -mobilization, change of intracellular cAMP and ligand internalization. Some tumor cell lines activated different OXR1-mediated effector systems, demonstrating a functionally active OXR1 in these cell lines.

In conclusion, the results from the functional- and in particular from the expression-analysis represents OXR1 as an promising target structure for targeted tumordiagnosis and -therapy approaches of carcinomas of the gastrointestinal tract.

7 Literaturverzeichnis

- Adeghate, E., Fernandez-Cabezudo, M., Hameed, R., El-Hasasna, H., El Wasila, M., Abbas, T., & al-Ramadi, B. (2010). Orexin-1 Receptor Co-Localizes with Pancreatic Hormones in Islet Cells and Modulates the Outcome of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. (K. Maedler, Ed.) *PLoS ONE*, 5(1), e8587.
- Ammoun, S., Holmqvist, T., Shariatmadari, R., Oonk, H. B., Detheux, M., Parmentier, M., Åkerman, K. E. O., et al. (2003). Distinct Recognition of OX 1 and OX 2 Receptors by Orexin Peptides. *Pharmacology*, 305(2), 507-514.
- Ammoun, S., Johansson, L., Ekholm, M. E., Holmqvist, T., Danis, A. S., Korhonen, L., Sergeeva, O. A., et al. (2006). OX1 orexin receptors activate extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells via multiple mechanisms: the role of Ca²⁺ influx in OX1 receptor signaling. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(1), 80-99.
- Ammoun, S., Lindholm, D., Wootz, H., Akerman, K. E. O., & Kukkonen, J. P. (2006). G-protein-coupled OX1 orexin/hcrtr-1 hypocretin receptors induce caspase-dependent and -independent cell death through p38 mitogen-/stress-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 281(2), 834-42.
- Arihara, Z., Takahashi, K., Murakami, O., Totsune, K., Sone, M., Satoh, F., Ito, S., et al. (2001). Immunoreactive orexin-A in human plasma. *Peptides*, 22(1), 139-142.
- Attwood, T. K., & Findlay, J. B. (1994). Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein engineering*, 7(2), 195-203.
- Baccari, M. C. (2010). Orexins and Gastrointestinal Functions. *Current Protein and Peptide Science*, 11(2), 8. Bentham Science Publishers.
- Becker, a, Hassenius, C., Licha, K., Ebert, B., Sukowski, U., Semmler, W., Wiedenmann, B., et al. (2001). Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands. *Nature biotechnology*, 19(4), 327-31.
- Bellmann-Sickert, K., & Beck-Sickinger, A. G. (2010). Peptide drugs to target G protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 31(9), 434-41.
- Ben-Shlomo, A., Schmid, H., Wawrowsky, K., Pichurin, O., Hubina, E., Chesnokova, V., Liu, N.-A., et al. (2009). Differential ligand-mediated pituitary somatostatin receptor subtype signaling: implications for corticotroph tumor therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 94(11), 4342-50.
- Bengtsson, M. W., Mäkelä, K., Sjöblom, M., Uotila, S., Akerman, K. E. O., Herzig, K.-H., & Flemström, G. (2007). Food-induced expression of orexin receptors in rat duodenal mucosa regulates the bicarbonate secretory response to orexin-A. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 293(2), G501-9.
- Blanco, M., García-Caballero, T., Fraga, M., Gallego, R., Cuevas, J., Forteza, J., Beiras, A., et al. (2002). Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regulatory Peptides*, 104(1-3), 161-165.
- Bockaert, J., & Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal*, 18(7), 1723-9.

- Bockaert, Joël, Marin, P., Dumuis, A., & Fagni, L. (2003). The “magic tail” of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS letters*, 546(1), 65-72.
- Bombardieri, E., Coliva, A., Maccauro, M., Seregini, E., Orunesu, E., Chiti, A., & Lucignani, G. (2010). Imaging of neuroendocrine tumours with gamma-emitting radiopharmaceuticals. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine*, 54(1), 3-15.
- Brady, A. E., & Limbird, L. E. (2002). G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction. *Cellular signalling*, 14(4), 297-309.
- Burdyga, G., Lal, S., Spiller, D., Jiang, W., Thompson, D., Attwood, S., Saeed, S., et al. (2003). Localization of orexin-1 receptors to vagal afferent neurons in the rat and humans. *Gastroenterology*, 124(1), 129-39.
- Chen, Jing, & Randeve, H. S. (2004). Genomic organization of mouse orexin receptors: characterization of two novel tissue-specific splice variants. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(11), 2790-804.
- Civelli, O., Saito, Y., Wang, Z., Nothacker, H.-P., & Reinscheid, R. K. (2006). Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacology & therapeutics*, 110(3), 525-32.
- Coleman, P. J., & Renger, J. J. (2010). Orexin receptor antagonists: a review of promising compounds patented since 2006. *Expert opinion on therapeutic patents*, 20(3), 307-24.
- Coleman, P. J., Cox, C. D., & Roecker, A. J. (2011). Discovery of dual orexin receptor antagonists (DORAs) for the treatment of insomnia. *Current topics in medicinal chemistry*, 11(6), 696-725.
- Cook, M. B., Chow, W.-H., & Devesa, S. S. (2009). Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005. *British journal of cancer*, 101(5), 855-9. Nature Publishing Group.
- Dalal, M. A., Schuld, A., Haack, M., Uhr, M., Geisler, P., Eisensehr, I., Noachtar, S., et al. (2001). Normal plasma levels of orexin A (hypocretin-1) in narcoleptic patients. *Neurology*, 56(12), 1749-1751.
- Dall’Aglio, C., Pedini, V., Scocco, P., Boiti, C., & Ceccarelli, P. (2010). Immunohistochemical evidence of Orexin-A in the pancreatic beta cells of domestic animals. *Research in veterinary science*, 89(2), 147-9.
- Dalrymple, M. B., Jaeger, W. C., Eidne, K. a, & Pflieger, K. D. G. (2011). Temporal profiling of orexin receptor-arrestin-ubiquitin complexes reveals differences between receptor subtypes. *The Journal of biological chemistry*, 286(19), 16726-33.
- Darker, J. G., Porter, R. a, Eggleston, D. S., Smart, D., Brough, S. J., Sabido-David, C., & Jerman, J. C. (2001). Structure-activity analysis of truncated orexin-A analogues at the orexin-1 receptor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11(5), 737-40.
- Date Y, U. Y., Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M. (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2), 748-753.
- Delpassand, E. S., Sims-Mourtada, J., Saso, H., Azhdarinia, A., Ashoori, F., Torabi, F., Espenan, G., et al. (2008). Safety and efficacy of radionuclide therapy with high-activity In-111 pentetretotide

- in patients with progressive neuroendocrine tumors. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 23(3), 292-300.
- Dessauer, C W, Tesmer, J. J., Sprang, S. R., & Gilman, A. G. (1999). The interactions of adenylylate cyclases with P-site inhibitors. *Trends in pharmacological sciences*, 20(5), 205-10.
- Devi, L. A. (2001). Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends in pharmacological sciences*, 22(10), 532-7.
- Digby, J. E., Chen, J., Tang, J. Y., Lehnert, H., Matthews, R. N., & Randeva, H. S. (2006). Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *The Journal of endocrinology*, 191(1), 129-36.
- Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*, 17(6), 1471-4.
- Ehrstrom, M. (2004). Pharmacokinetic profile of orexin A and effects on plasma insulin and glucagon in the rat. *Regulatory Peptides*, 119(3), 209-212.
- Ehrström, M, Näslund, E., Ma, J., Kirchgessner, A. L., & Hellström, P. M. (2003). Physiological regulation and NO-dependent inhibition of migrating myoelectric complex in the rat small bowel by OXA. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 285(4), G688-95.
- Ehrström, M, Gustafsson, T., Finn, A., Kirchgessner, A., Grybäck, P., Jacobsson, H., Hellström, P. M., et al. (2005). Inhibitory effect of exogenous orexin a on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(4), 2370-7.
- Ehrström, Marcus, Levin, F., Kirchgessner, A. L., Schmidt, P. T., Hilsted, L. M., Gryba, P., Jacobsson, H., et al. (2005). Stimulatory effect of endogenous orexin A on gastric emptying and acid secretion independent of gastrin. *Regulatory Peptides*, 132, 9-16.
- Ekhholm, Marie E, Johansson, L., & Kukkonen, J. P. (2007). IP3-independent signalling of OX1 orexin/hypocretin receptors to Ca²⁺ influx and ERK. *Biochemical and biophysical research communications*, 353(2), 475-80.
- El Far, O., & Betz, H. (2002). G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes. *The Biochemical journal*, 365(Pt 2), 329-36.
- Ellis, J., Pediani, J. D., Canals, M., Milasta, S., & Milligan, G. (2006). Orexin-1 Receptor-Cannabinoid CB1 Receptor Heterodimerization Results in Both Ligand-dependent and -independent Coordinated Alterations of Receptor Localization and Function. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38812-38824.
- Erem, C., Hacıhasanoğlu, A., Sari, A., Onder Ersöz, H., Ukinç, K., & Fidan, S. (2004). A rare case and a rapid tumor response to therapy: dramatic reduction in tumor size during octreotide treatment in a patient with TSH-secreting pituitary macroadenoma. *Endocrine*, 25(2), 141-5.
- Evans, N. a., Groarke, D. A., Warrack, J., Greenwood, C. J., Dodgson, K., Milligan, G., & Wilson, S. (2001). Visualizing differences in ligand-induced β -arrestin-GFP interactions and trafficking between three recently characterized G protein-coupled receptors. *Journal of Neurochemistry*, 77(2), 476-485.

- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews*, 53(1), 1-24.
- Flower, D. R. (1999). Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochimica et biophysica acta*, 1422(3), 207-34.
- Foord, S M, & Marshall, F. H. (1999). RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 20(5), 184-7.
- Foord, Steven M, Bonner, T. I., Neubig, R. R., Rosser, E. M., Pin, J.-P., Davenport, A. P., Spedding, M., et al. (2005). International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacological reviews*, 57(2), 279-88.
- Frangioni, J. V. (2008). New technologies for human cancer imaging. *Journal of clinical oncology*: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 26(24), 4012-21.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*, 63(6), 1256-72.
- Freedman, N. D., Abnet, C. C., Leitzmann, M. F., Mouw, T., Subar, A. F., Hollenbeck, A. R., & Schatzkin, A. (2007). A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *American journal of epidemiology*, 165(12), 1424-33.
- Gautvik, K. M., de Lecea, L., Gautvik, V. T., Danielson, P. E., Tranque, P., Dopazo, A., Bloom, F. E., et al. (1996). Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16), 8733-8.
- George, S. R., Dowd, B. F. O., & Lee, S. P. (2002). G-PROTEIN-COUPLED RECEPTOR OLIGOMERIZATION AND ITS POTENTIAL FOR DRUG DISCOVERY. *Discovery*, 1(October), 808-820.
- Gesty-Palmer, D., & Luttrell, L. M. (2008). Heptahelical terpsichory. Who calls the tune? *Journal of receptor and signal transduction research*, 28(1-2), 39-58.
- Gether, U. (2000). Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocrine Reviews*, 21(1), 90-113.
- Gilman, a G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual review of biochemistry*, 56, 615-49.
- Ginj, M., Zhang, H., Waser, B., Cescato, R., Wild, D., Wang, X., Erchegyi, J., et al. (2006). Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16436-41.
- Gloriam, D. E., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2007). The G protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC genomics*, 8, 338.
- Greasley, P J, Fanelli, F., Scheer, A., Abuin, L., Nenniger-Tosato, M., DeBenedetti, P. G., & Cotecchia, S. (2001). Mutational and computational analysis of the alpha(1b)-adrenergic receptor. Involvement of basic and hydrophobic residues in receptor activation and G protein coupling. *The Journal of biological chemistry*, 276(49), 46485-94.

- Greasley, Peter J, Fanelli, F., Rossier, O., Abuin, L., & Cotecchia, S. (2002). Mutagenesis and modelling of the alpha(1b)-adrenergic receptor highlight the role of the helix 3/helix 6 interface in receptor activation. *Molecular pharmacology*, 61(5), 1025-32.
- Groom, C. R., & Hopkins, A. L. (2002). Protein kinase drugs--optimism doesn't wait on facts. *Drug discovery today*, 7(15), 801-2.
- Grötzinger, Carsten, & Wiedenmann, B. (2004). Somatostatin Receptor Targeting for Tumor Imaging and Therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1014(1), 258-264.
- Göncz, E., Strowski, M. Z., Grötzinger, C., Nowak, K. W., Kaczmarek, P., Sassek, M., Mergler, S., et al. (2008). Orexin-A inhibits glucagon secretion and gene expression through a Foxo1-dependent pathway. *Endocrinology*, 149(4), 1618-26.
- Hagan, J. J., Leslie, R. A., Patel, S., Evans, M. L., Wattam, T. A., Holmes, S., Benham, C. D., et al. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), 10911-6.
- Hall, R a, Premont, R. T., & Lefkowitz, R. J. (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *The Journal of cell biology*, 145(5), 927-32.
- Hanyaloglu, A. C., & von Zastrow, M. (2008). Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 48, 537-68.
- Hara, J., Beuckmann, C. T., Nambu, T., Willie, J. T., Chemelli, R. M., Sinton, C. M., Sugiyama, F., et al. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, 30(2), 345-54.
- Harmar, A. J., Hills, R. a, Rosser, E. M., Jones, M., Buneman, O. P., Dunbar, D. R., Greenhill, S. D., et al. (2009). IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), D680-5.
- Harris DM, G. V., Reeve JR Jr, Wu SV. (2002). Stimulation of amylase release by Orexin is mediated by Orexin 2 receptor in AR42J cells. *Pancreas*. 25(4):405-10.
- Harris, D. M., Go, V. L. W., Reeve, J. R., & Wu, S. V. (2002). Stimulation of amylase release by Orexin is mediated by Orexin 2 receptor in AR42J cells. *Pancreas*, 25(4), 405-10.
- Heinonen, M. V., Purhonen, A. K., Mäkelä, K. A., & Herzig, K. H. (2008). Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 192(4), 471-85.
- Hermans, E. (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 99(1), 25-44.
- Hilairret, S., Bouaboula, M., Carrière, D., Le Fur, G., & Casellas, P. (2003). Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. *The Journal of biological chemistry*, 278(26), 23731-7.
- Hildebrandt, J. D. (1997). Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochemical pharmacology*, 54(3), 325-39.

- Holmqvist, T. (2002). Orexin signaling in recombinant neuron-like cells. *FEBS Letters*, 526(1-3), 11-14.
- Holmqvist, Tomas, Åkerman, K. E. ., & Kukkonen, J. P. (2001). High specificity of human orexin receptors for orexins over neuropeptide Y and other neuropeptides. *Neuroscience Letters*, 305(3), 177-180.
- Holmqvist, Tomas, Akerman, K. E. O., & Kukkonen, J. P. (2002). Orexin signaling in recombinant neuron-like cells. *FEBS letters*, 526(1-3), 11-4.
- Holmqvist, Tomas, Johansson, L., Ostman, M., Ammoun, S., Akerman, K. E. O., & Kukkonen, J. P. (2005). OX1 orexin receptors couple to adenylyl cyclase regulation via multiple mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 280(8), 6570-9.
- Hopkins, A. L., & Groom, C. R. (2002). The druggable genome. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(9), 727-30.
- Horn, F., Weare, J., Beukers, M. W., Hörsch, S., Bairoch, A., Chen, W., Edvardsen, O., et al. (1998). GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic acids research*, 26(1), 275-9.
- [Http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/esophageal-cancer/images/esophageal-cancerfig2_large.jpg](http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/esophageal-cancer/images/esophageal-cancerfig2_large.jpg).
- [Http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-71560_assayprinciple_220x220.jpg](http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-71560_assayprinciple_220x220.jpg).
- [Http://www.srubiosystems.com/images/WavelengthPrinciplesNumbersCell.jpg](http://www.srubiosystems.com/images/WavelengthPrinciplesNumbersCell.jpg).
- Huber, T., & Sakmar, T. P. (2011). Escaping the flatlands: new approaches for studying the dynamic assembly and activation of GPCR signaling complexes. *Trends in pharmacological sciences*, 32(7), 410-419. Elsevier Ltd.
- Ito, N., Yabe, T., Gamo, Y., Nagai, T., Oikawa, T., Yamada, H., & Hanawa, T. (2008). I.c.v. administration of orexin-A induces an antidepressive-like effect through hippocampal cell proliferation. *Neuroscience*, 157(4), 720-32.
- Jacoby, E. (2006). Designing compound libraries targeting GPCRs. *Ernst Schering Foundation symposium proceedings*, (2), 93-103.
- Jacoby, Edgar, Bouhelal, R., Gerspacher, M., & Seuwen, K. (2006). The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*, 1(8), 761-82.
- Janecka, A., Zubrzycka, M., & Janecki, T. (2001). Somatostatin analogs. *The journal of peptide research*: official journal of the American Peptide Society, 58(2), 91-107.
- Johansson, L, Ekholm, M. E., & Kukkonen, J. P. (2007). Regulation of OX1 orexin/hypocretin receptor-coupling to phospholipase C by Ca²⁺ influx. *British journal of pharmacology*, 150(1), 97-104.
- Johansson, L, Ekholm, M. E., & Kukkonen, J. P. (2008). Multiple phospholipase activation by OX(1) orexin/hypocretin receptors. *Cellular and molecular life sciences*: CMLS, 65(12), 1948-56.
- Jääntti, M. H., Putula, J., Somerharju, P., Frohman, M. A., & Kukkonen, J. P. (2011). OX(1) orexin/hypocretin receptor activation of phospholipase D. *British journal of pharmacology*.

- Jöhren, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, D. P. (2001). Prepro-Orexin and Orexin Receptor mRNAs Are Differentially Expressed in Peripheral Tissues of Male and Female Rats. *Endocrinology*, 142(8), 3324-3331.
- Jöhren, O, Brüggemann, N., & Dominiak, P. (2004). Orexins (hypocretins) and adrenal function. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 36(6), 370-5.
- Kagerer, S. M., & Jöhren, O. (2010). Interactions of orexins/hypocretins with adrenocortical functions. *Acta Physiologica*, 198(3), 361-371.
- Kamangar, F., Dores, G. M., & Anderson, W. F. (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *Journal of clinical oncology*: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 24(14), 2137-50.
- Kamenetsky, M., Middelhaufe, S., Bank, E. M., Levin, L. R., Buck, J., & Steegborn, C. (2006). Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *Journal of molecular biology*, 362(4), 623-39.
- Karteris, E. (2001). Expression and Coupling Characteristics of the CRH and Orexin Type 2 Receptors in Human Fetal Adrenals. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(9), 4512-4519.
- Karteris, E. (2004). Expression of Human Prepro-Orexin and Signaling Characteristics of Orexin Receptors in the Male Reproductive System. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(4), 1957-1962.
- Karteris, Emmanouil, & Randevara, H. S. (2003). Orexin receptors and G-protein coupling: evidence for another “promiscuous” seven transmembrane domain receptor. *Journal of pharmacological sciences*, 93(1), 126-8.
- Karteris, Emmanouil, Machado, R. J., Chen, J., Zervou, S., Hillhouse, E. W., & Randevara, H. S. (2005). Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 288(6), E1089-100.
- Kastin, A. J., & Akerstrom, V. (1999). Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 289(1), 219-23.
- Keereweer, S., Mol, I. M., Vahrmeijer, A. L., Van Driel, P. B. a a, Baatenburg de Jong, R. J., Kerrebijn, J. D. F., & Löwik, C. W. G. M. (2012). Dual wavelength tumor targeting for detection of hypopharyngeal cancer using near-infrared optical imaging in an animal model. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 1-26.
- Kenakin, T. (2002). Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 42, 349-79.
- Kenakin, T. (2007). Allosteric theory: taking therapeutic advantage of the malleable nature of GPCRs. *Current neuropharmacology*, 5(3), 149-56.
- Khilnani, G., & Khilnani, A. K. (2011). Inverse agonism and its therapeutic significance. *Indian journal of pharmacology*, 43(5), 492-501.

- Kim, M.-K., Park, H.-J., Kim, S.-R., Choi, Y. K., Shin, H. K., Jeon, J.-H., Jang, H.-O., et al. (2010). Angiogenic role of orexin-A via the activation of extracellular signal-regulated kinase in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 403(1), 59-65. Elsevier Inc.
- Kirchgessner, Annette L., & Liu, M.-tsai. (1999). Orexin Synthesis and Response in the Gut. *Neuron*, 24(4), 941-951.
- Kolakowski, L. F. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & channels*, 2(1), 1-7.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407(6805), 789-95.
- Kukkonen, J. P. C. Å., Karl E. O. (2001). Orexin receptors couple to Ca²⁺ channels different from store-operated Ca²⁺ channels. *Neuroreport Issue: Volume 12(9), 3 July 2001, pp 2017-2020*.
- Kukkonen, Jyrki P, Holmqvist, T., Ammoun, S., & Akerman, K. E. O. (2002). Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *American journal of physiology. Cell physiology*, 283(6), C1567-91.
- Laburthe, M, Voisin, T., & El Firar, A. (2010). Orexins/hypocretins and orexin receptors in apoptosis: a mini-review. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 198(3), 393-402.
- Laburthe, M, & Couvineau, A. (2002). Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regulatory peptides*, 108(2-3), 165-73.
- Laburthe, M, Couvineau, A., Gaudin, P., Maoret, J. J., Rouyer-Fessard, C., & Nicole, P. (1996). Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 805, 94-109; discussion 110-1.
- Lagergren, J., & Lagergren, P. (2010). Oesophageal cancer. *BMJ (Clinical research ed.)*, 341, c6280.
- Lagerström, M. C., & Schiöth, H. B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(4), 339-57.
- Lang, M., Bufe, B., De Pol, S., Reiser, O., Meyerhof, W., & Beck-Sickinger, A. G. (2006). Structural properties of orexins for activation of their receptors. *Journal of peptide science*: an official publication of the European Peptide Society, 12(4), 258-66.
- Lang, M., Söll, R. M., Dürrenberger, F., Dautzenberg, F. M., & Beck-Sickinger, A. G. (2004). Structure-activity studies of orexin a and orexin B at the human orexin 1 and orexin 2 receptors led to orexin 2 receptor selective and orexin 1 receptor preferring ligands. *Journal of medicinal chemistry*, 47(5), 1153-60.
- Larsson, K. P., Peltonen, H. M., Bart, G., Louhivuori, L. M., Penttonen, A., Antikainen, M., Kukkonen, J. P., et al. (2005). Orexin-A-induced Ca²⁺ entry: evidence for involvement of trpc channels and protein kinase C regulation. *The Journal of biological chemistry*, 280(3), 1771-81.
- Lee, J.-H., Bang, E., Chae, K.-J., Kim, J.-Y., Lee, D. W., & Lee, W. (1999). Solution structure of a new hypothalamic neuropeptide, human hypocretin-2/orexin-B. *European Journal of Biochemistry*, 266(3), 831-839.

- Lefkowitz, Robert J. (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 25(8), 413-22.
- Leong, K. G., & Karsan, A. (2000). Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. *Histology and histopathology*, 15(4), 1303-25.
- Liu, Q., Cescato, R., Dewi, D. A., Rivier, J., Reubi, J.-C., & Schonbrunn, A. (2005). Receptor signaling and endocytosis are differentially regulated by somatostatin analogs. *Molecular pharmacology*, 68(1), 90-101.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-8.
- Loke, L., & Shen, C. (1995). Cytokeratin expression in non-neoplastic oesophageal epithelium and squamous cell carcinoma of the oesophagus. *American Journal of Clinical Pathology*, 345-349.
- Lund, P. E., Shariatmadari, R., Uustare, a, Detheux, M., Parmentier, M., Kukkonen, J. P., & Akerman, K. E. (2000). The orexin OX1 receptor activates a novel Ca²⁺ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *The Journal of biological chemistry*, 275(40), 30806-12. doi:10.1074/jbc.M002603200
- Luttrell, L. M. (1999). -Arrestin-Dependent Formation of 2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes. *Science*, 283(5402), 655-661. doi:10.1126/science.283.5402.655
- Luttrell, Louis M. (2005). Composition and function of g protein-coupled receptor signalsomes controlling mitogen-activated protein kinase activity. *Journal of molecular neuroscience* □: MN, 26(2-3), 253-64.
- Luttrell, Louis M, & Gesty-palmer, D. (2010). Beyond Desensitization □: Physiological Relevance of Arrestin-Dependent Signaling. *Pharmacological Reviews*.
- Malendowicz, L K, Jedrzejczak, N., Belloni, A. S., Trejter, M., Hochól, A., & Nussdorfer, G. G. (2001). Effects of orexins A and B on the secretory and proliferative activity of immature and regenerating rat adrenal glands. *Histology and histopathology*, 16(3), 713-7.
- Malendowicz, L K, Tortorella, C., & Nussdorfer, G. G. (1999). Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 70(4-6), 185-8.
- Marinissen, M. J., & Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends in pharmacological sciences*, 22(7), 368-76.
- Marinissen, M. J., Chiariello, M., & Gutkind, J. S. (2001). Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma) MAP kinase pathway. *Genes & development*, 15(5), 535-53.
- Maudsley, S., Martin, B., & Luttrell, L. M. (2005). The origins of diversity and specificity in g protein-coupled receptor signaling. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 314(2), 485-94.
- McAtee, L. C., Sutton, S. W., Rudolph, D. A., Li, X., Aluisio, L. E., Phuong, V. K., Dvorak, C. A., et al. (2004). Novel substituted 4-phenyl-[1,3]dioxanes: potent and selective orexin receptor 2 (OX(2)R) antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(16), 4225-9.

- Milasta, Sandra, Evans, N. A., Ormiston, L., Wilson, S., Lefkowitz, R. J., & Milligan, G. (2005). The sustainability of interactions between the orexin-1 receptor and beta-arrestin-2 is defined by a single C-terminal cluster of hydroxy amino acids and modulates the kinetics of ERK MAPK regulation. *The Biochemical journal*, 387(Pt 3), 573-84.
- Moody, T W, Zia, F., Venugopal, R., Fagarasan, M., Oie, H., & Hu, V. (1996). GRP receptors are present in non small cell lung cancer cells. *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, 24, 247-56.
- Moody, Terry W, Chan, D., Fahrenkrug, J., & Jensen, R. T. (2003). Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Current pharmaceutical design*, 9(6), 495-509.
- Moore, C. a C., Milano, S. K., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual review of physiology*, 69, 451-82.
- Nakabayashi, M., Suzuki, T., Takahashi, K., Totsune, K., Muramatsu, Y., Kaneko, C., Date, F., Takeyama, J., Darnel, A. D., Moriya, T., & Sasano, H. (2003a). Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 205(1-2), 43-50.
- Nakabayashi, M., Suzuki, T., Takahashi, K., Totsune, K., Muramatsu, Y., Kaneko, C., Date, F., Takeyama, J., Darnel, A. D., Moriya, T., & Sasano, H. (2003b). Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 205(1-2), 43-50.
- Nanmoku, T., Isobe, K., Sakurai, T., Yamanaka, A., Takekoshi, K., Kawakami, Y., Goto, K., et al. (2002). Effects of orexin on cultured porcine adrenal medullary and cortex cells. *Regulatory Peptides*, 104(1-3), 125-130.
- Näslund, E., Ehrström, M., Ma, J., Hellström, P. M., & Kirchgessner, a L. (2002a). Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 282(3), G470-9.
- Näslund, E., Ehrström, M., Ma, J., Hellström, P. M., & Kirchgessner, A. L. (2002b). Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 282(3), G470-9.
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., & Caron, M. G. (1999). Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *The Journal of biological chemistry*, 274(45), 32248-57.
- Okumura, T., Takeuchi, S., Motomura, W., Yamada, H., Egashira Si, S., Asahi, S., Kanatani, a, et al. (2001). Requirement of intact disulfide bonds in orexin-A-induced stimulation of gastric acid secretion that is mediated by OX1 receptor activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 280(4), 976-81.
- Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Quarterly reviews of biophysics*, 39(2), 117-66.
- Ouedraogo, R., Naslund, E., & Kirchgessner, A. L. (2003). Glucose Regulates the Release of Orexin-A From the Endocrine Pancreas. *Diabetes*, 52(1), 111-117.
- Pessaux, P., Kianmanesh, R., Regimbeau, J.-M., Sastre, B., Delcenserie, R., Sielezneff, I., Arnaud, J.-P., et al. (2006). Frey procedure in the treatment of chronic pancreatitis: short-term results. *Pancreas*, 33(4), 354-8.

- Peters, M. F., & Scott, C. W. (2009). Evaluating cellular impedance assays for detection of GPCR pleiotropic signaling and functional selectivity. *Journal of biomolecular screening*, 14(3), 246-55.
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1998). Neurons Containing Hypocretin (Orexin) Project to Multiple Neuronal Systems. *J. Neurosci.*, 18(23), 9996-10015.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(9), 639-50.
- Premont RT, Inglese J, L. R. (1995). Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J.*, 9(2), 175-182.
- Premont, Richard T, & Gainetdinov, R. R. (2007). Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual review of physiology*, 69, 511-34.
- Putula, Jaana, & Kukkonen, J. P. (2011). Mapping of the binding sites for the OX(1) orexin receptor antagonist, SB-334867, using orexin/hypocretin receptor chimaeras. *Neuroscience letters*, 506(1), 115-111.
- R.H. Stoffel III, J.A. Pitcher, R. J. L. (1997). Targeting G Protein-coupled Receptor Kinases to Their Receptor Substrates. *J. Membrane Biol.*, 157, 1-8.
- Raffaella Spinazzi, A. Z., Giuliano Neri, Magdalena Nowak, Piera Rebuffat, Gatone G. Nussdorfer, Paola G. Andreis, Ludwik K. Malendowicz. (2005). Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *International Journal of Molecular Medicine*, 15(5), 847.
- Rajagopal, R., Chen, Z.-Y., Lee, F. S., & Chao, M. V. (2004). Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience, 24(30), 6650-8.
- Ramanjaneya, M., Conner, a. C., Chen, J., Stanfield, P. R., & Randeva, H. S. (2008). Orexins Stimulate Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression through Multiple Signaling Pathways in Human Adrenal H295R Cells. *Endocrinology*, 149(8), 4106-4115.
- Ramanjaneya, Manjunath, Conner, A. C., Chen, J., Kumar, P., Brown, J. E. P., Jöhren, O., Lehnert, H., et al. (2009). Orexin-stimulated MAP kinase cascades are activated through multiple G-protein signalling pathways in human H295R adrenocortical cells: diverse roles for orexins A and B. *The Journal of endocrinology*, 202(2), 249-61.
- Randeva HS, K. E., Grammatopoulos D, Hillhouse EW. (2001). Expression of Orexin-A and Functional Orexin Type 2 Receptors in the Human Adult Adrenals: Implications for Adrenal Function and Energy Homeostasis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(10), 4808-4813.
- Reiter, E., & Lefkowitz, R. J. (2006). GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 17(4), 159-65.

- Reubi, J C, & Landolt, A. M. (1984). High density of somatostatin receptors in pituitary tumors from acromegalic patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 59(6), 1148-51.
- Reubi, Jean Claude. (2007). Peptide receptor expression in GEP-NET. *Virchows Archiv*: an international journal of pathology, 451 Suppl , S47-50.
- Reubi, Jean Claude, Waser, B., Cescato, R., Gloor, B., Stettler, C., & Christ, E. (2010). Internalized somatostatin receptor subtype 2 in neuroendocrine tumors of octreotide-treated patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(5), 2343-50.
- Ritter, S. L., & Hall, R. a. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(12), 819-30. Nature Publishing Group.
- Roecker, A. J., & Coleman, P. J. (2008a). Orexin Receptor Antagonists: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(11), 977-987.
- Roecker, A. J., & Coleman, P. J. (2008b). Orexin receptor antagonists: medicinal chemistry and therapeutic potential. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(11), 977-87.
- Rondard, P., Goudet, C., Kniazeff, J., Pin, J.-P., & Prézeau, L. (2011). The complexity of their activation mechanism opens new possibilities for the modulation of mGlu and GABAB class C G protein-coupled receptors. *Neuropharmacology*, 60(1), 82-92.
- Ross, E. M., & Wilkie, T. M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annual review of biochemistry*, 69, 795-827. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- Rouet-Benzineb, Patricia, Rouyer-Fessard, C., Jarry, A., Avondo, V., Pouzet, C., Yanagisawa, M., Laboisie, C., et al. (2004). Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 279(44), 45875-86.
- Sadana, R., & Dessauer, C. W. (2009). Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neuro-Signals*, 17(1), 5-22.
- Sakurai, T, Amemiya, a, Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., et al. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92(4), 573-85.
- Sakurai, Takeshi, Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., et al. (1998). Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell*, 92(4), 573-585.
- Samson, W. K., Gosnell, B., Chang, J. K., Resch, Z. T., & Murphy, T. C. (1999). Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain research*, 831(1-2), 248-53.
- Sato, M., Blumer, J. B., Simon, V., & Lanier, S. M. (2006). Accessory proteins for G proteins: partners in signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 46, 151-87.
- Scammell, T. E., & Winrow, C. J. (2011). Orexin receptors: pharmacology and therapeutic opportunities. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 51, 243-66.

- Scarselli, M., & Donaldson, J. G. (2009). Constitutive internalization of G protein-coupled receptors and G proteins via clathrin-independent endocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 284(6), 3577-85.
- Schally, A. V. (1988). Oncological Applications of Somatostatin Analogues. *Cancer Research*, 48(11), 6977-6985.
- Schiöth, H. B., & Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 142, 94-101.
- Schuchert, M. J., Luketich, J. D., & Landreneau, R. J. (2010). Management of esophageal cancer. *Current problems in surgery*, 47(11), 845-946.
- Sellayah, D., Bharaj, P., & Sikder, D. (2011). Orexin Is Required for Brown Adipose Tissue Development, Differentiation, and Function. *Cell Metabolism*, 14(4), 478-490.
- Serebryany, E., Zhu, G. A., & Yan, E. C. Y. (2011). Artificial membrane-like environments for in vitro studies of purified G-protein coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta*. Elsevier B.V.
- Shirasaka, T., Nakazato, M., Matsukura, S., Takasaki, M., & Kannan, H. (1999). Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *The American journal of physiology*, 277(6 Pt 2), R1780-5.
- Sikder, D., & Kodadek, T. (2007). The neurohormone orexin stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity. *Genes & Development*, 21(22), 2995-3005.
- Silveyra, P., Lux-Lantos, V., & Libertun, C. (2007). Both orexin receptors are expressed in rat ovaries and fluctuate with the estrous cycle: effects of orexin receptor antagonists on gonadotropins and ovulation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 293(4), E977-85.
- Skrzypski, M., T Le, T., Kaczmarek, P., Pruszynska-Oszmalek, E., Pietrzak, P., Szczepankiewicz, D., Kolodziejcki, P. A., et al. (2011). Orexin A stimulates glucose uptake, lipid accumulation and adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes and isolated primary rat adipocytes. *Diabetologia*, 54(7), 1841-52. Springer Berlin / Heidelberg.
- Smart, D., Jerman, J. C., Brough, S. J., Rushton, S. L., Murdock, P. R., Jewitt, F., Elshourbagy, N. A., et al. (1999). Characterization of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese hamster ovary cell-line using FLIPR. *British journal of pharmacology*, 128(1), 1-3.
- Smart, D., Sabido-David, C., Brough, S. J., Jewitt, F., Johns, a, Porter, R. a, & Jerman, J. C. (2001). SB-334867-A: the first selective orexin-1 receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 132(6), 1179-1182.
- Spinazzi, R., Rucinski, M., Neri, G., Malendowicz, L. K., & Nussdorfer, G. G. (2005). Preproorexin and orexin receptors are expressed in cortisol-secreting adrenocortical adenomas, and orexins stimulate in vitro cortisol secretion and growth of tumor cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(6), 3544-9.
- Spinazzi, Raffaella, Ziolkowska, A., Neri, G., Nowak, M., Rebuffat, P., Nussdorfer, G. G., Andreis, P. G., et al. (2005). Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *International journal of molecular medicine*, 15(5), 847-52.

- Steidl, U., Bork, S., Schaub, S., Selbach, O., Seres, J., Aivado, M., Schroeder, T., et al. (2004). Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators. *Blood*, *104*(1), 81-8.
- Takahashi, K., Arihara, Z., Suzuki, T., Sone, M., Kikuchi, K., Sasano, H., Murakami, O., et al. (2006). Expression of orexin-A and orexin receptors in the kidney and the presence of orexin-A-like immunoreactivity in human urine. *Peptides*, *27*(4), 871-7.
- Takahashi, N., Okumura, T., Yamada, H., & Kohgo, Y. (1999). Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochemical and biophysical research communications*, *254*(3), 623-7.
- Takeda, S., Yamamoto, A., Okada, T., Matsumura, E., Nose, E., Kogure, K., Kojima, S., et al. (2003). Identification of surrogate ligands for orphan G protein-coupled receptors. *Life sciences*, *74*(2-3), 367-77.
- Takeshi Sakurai, T. M., Keiko Furuya, Noriko Kajiwara, Toshiaki Nakamura, Masashi Yanagisawa|| and Katsutoshi Goto. (1999). Structure and Function of Human Prepro-orexin Gene. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(25), 17771-17776.
- Takeshi Sakurai, T. M., Keiko Furuya, Noriko Kajiwara, Toshiaki Nakamura, Masashi Yanagisawa|| and, & Katsutoshi Goto‡. (1999). Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regulatory Peptides*, *85*(1), 25-30.
- Tang, X.-L., Wang, Y., Li, D.-L., Luo, J., & Liu, M.-Y. (2012). Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta pharmacologica Sinica*, *33*(3), 363-71.
- Tohgo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J., & Luttrell, L. M. (2002). beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *The Journal of biological chemistry*, *277*(11), 9429-36.
- Turunen, P. M., Ekholm, M. E., Somerharju, P., & Kukkonen, J. P. (2010). Arachidonic acid release mediated by OX1 orexin receptors. *British journal of pharmacology*, *159*(1), 212-21. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00535.x
- Ulrich, C. D., Holtmann, M., & Miller, L. J. (1998). Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors. *Gastroenterology*, *114*(2), 382-97.
- Urwyler, S. (2011). Allosteric modulation of family C G-protein-coupled receptors: from molecular insights to therapeutic perspectives. *Pharmacological reviews*, *63*(1), 59-126.
- Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., Brown, A., et al. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(8), 4903-8.
- Verkaar, F., van Rosmalen, J. W. G., Blumenröhr, M., van Koppen, C. J., Blankesteyn, W. M., Smits, J. F. M., & Zaman, G. J. R. (2008). G protein-independent cell-based assays for drug discovery on seven-transmembrane receptors. *Biotechnology annual review*, *14*, 253-74.
- Violin, J. D., & Lefkowitz, R. J. (2007). Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends in pharmacological sciences*, *28*(8), 416-22.

- Voisin, T., Rouet-Benzineb, P., Reuter, N., & Laburthe, M. (2003). Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cellular and molecular life sciences*: CMLS, 60(1), 72-87.
- Voisin, T. (2006). Orexin-Induced Apoptosis: The Key Role of the Seven-Transmembrane Domain Orexin Type 2 Receptor. *Endocrinology*, 147(10), 4977-4984.
- Voisin, Thierry, El Firar, A., Fasseu, M., Rouyer-Fessard, C., Descatoire, V., Walker, F., Paradis, V., et al. (2011). Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis. *Cancer research*.
- Voisin, Thierry, El Firar, A., Rouyer-Fessard, C., Gratio, V., & Laburthe, M. (2008). A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. *The FASEB journal*: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 22(6), 1993-2002.
- Wada, S., Ikemoto, S., Terada, T., Tanaka, H., Kamizuru, M., Sakamoto, W., Kishimoto, T., et al. (1991). Combined therapy of interleukin 2 with cyclophosphamide or bacillus Calmette-Guérin against implanted bladder cancer cells in mice. *Urologia internationalis*, 47 Suppl 1, 104-7.
- Wang, L., Martin, B., Brenneman, R., Luttrell, L. M., & Maudsley, S. (2009). Allosteric Modulators of G Protein-Coupled Receptors: Future Therapeutics for Complex Physiological Disorders, 331(2), 340-348.
- Ward, R. J., Pediani, J. D., & Milligan, G. (2011a). Heteromultimerization of Cannabinoid CB 1 Receptor and Orexin OX 1 Receptor Generates a Unique Complex in Which Both Protomers Are Regulated by Orexin A * . *Journal of Biological Chemistry*, 286(43), 37414-37428.
- Ward, R. J., Pediani, J. D., & Milligan, G. (2011b). Ligand-induced internalization of the orexin OX(1) and cannabinoid CB(1) receptors assessed via N-terminal SNAP and CLIP-tagging. *British journal of pharmacology*, 162(6), 1439-52.
- Weiner, R. E., & Thakur, M. L. (2002). Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. *Applied radiation and isotopes*: including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine, 57(5), 749-63.
- Wenzel, J., Grabinski, N., Knopp, C. A., Dendorfer, A., Ramanjaneya, M., Randevara, H. S., Ehrhart-Bornstein, M., et al. (2009). Hypocretin/orexin increases the expression of steroidogenic enzymes in human adrenocortical NCI H295R cells. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 297(5), R1601-9.
- Whalen, E. J., Rajagopal, S., & Lefkowitz, R. J. (2011). Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends in molecular medicine*, 17(3), 126-39. Elsevier Ltd.
- Willie Jon T., Chemelli, R. M., Sinton, C. M., & Yanagisawa, M. (2003). TO EAT OR TO SLEEP? OREXIN IN THE REGULATION OF FEEDING AND WAKEFULNESS. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- Woldan-Tambor, A., Biegańska, K., Wiktorowska-Owczarek, A., & Zawilska, J. B. (2011). Activation of orexin/hypocretin type 1 receptors stimulates cAMP synthesis in primary cultures of rat astrocytes. *Pharmacological reports*: PR, 63(3), 717-23.

- Wong, S. K.-F. (2003). G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. *Neurosignals*, 12(1), 1-12.
- Ziolkowska, A., & Rucinski, M. (2008). Orexin B inhibits proliferation and stimulates specialized function of cultured rat calvarial osteoblast-like cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 749-755.
- Ziolkowska, A., Spinazzi, R., Albertin, G., Nowak, M., Malendowicz, L. K., Tortorella, C., & Nussdorfer, G. G. (2005). Orexins stimulate glucocorticoid secretion from cultured rat and human adrenocortical cells, exclusively acting via the OX1 receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 96(5), 423-9.
- Zwirska-Korczala, K., Adamczyk-Sowa, M., Sowa, P., Pilc, K., Suchanek, R., Pierzchala, K., Namyslowski, G., et al. (2007). Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *Journal of physiology and pharmacology*: an official journal of the Polish Physiological Society, 58 Suppl 1, 53-64.
- de Lecea, L. (1998). The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), 322-327.

8 Anhang

Tab. 12: Angabe der statistisch ermittelten Zellzahlen verschiedener Stadien des Zellzyklus und der Apoptotischen Zellen nach 48h Behandlung mit Medium, Orexin und TNF α +CHx.

		Zellen in % (Population1)			
48h, n=2		M1=Sub-G1 (Apoptotische Zellen)	M2= G1-Phase	M3= S-Phase	M4= G2-Phase
HT-29	A) Medium	1,5 \pm 0,6	62,3 \pm 6,4	24,5 \pm 5,4	11,2 \pm 0,5
	B) OXA	1,7 \pm 1,0	61,2 \pm 4,7	25,2 \pm 3,2	11 \pm 0,6
	C) OXB	1,8 \pm 1,1	62,5 \pm 8,0	23,8 \pm 5,4	11,1 \pm 0,9
	D) TNFα+CHx	34,9 \pm 10,5	33,7 \pm 40,1	12,0 \pm 2,9	8,2 \pm 2,1
Stabiler Klon	A) Medium	8,1 \pm 0,8	57,3 \pm 2,8	24,8 \pm 0,9	7,2 \pm 3,8
	B) OXA	10,7 \pm 0,6	57,6 \pm 5,2	22,3 \pm 0,6	8,1 \pm 4,3
	C) OXB	8,5 \pm 1,7	56,7 \pm 0,4	22,2 \pm 0,6	8,0 \pm 4,2
	D) TNFα+CHx	77,0 \pm 11,5	5,7 \pm 5,0	3,2 \pm 2,3	0,9 \pm 0,2

Tab. 13: Angabe der Aminosäure Sequenzen, Molekulargewichte und Reinheit der benutzten OXA Varianten.

Sequenz	Name	MW soll	MW ist	Reinheit %
Pyr-PLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL	linOXA	3565	3566	93 %
Pyr-PLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL	zyOXA	3561	3563	98 %
IDCC-SGSPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL	linOXA-IDCC	4337	4339	96 %
IDCC-SGSPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL	zyOXA-IDCC	4333	4336	98%

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der drei größten Klassen von GPCRs.	3
Abb. 2: Schematische Darstellung der möglichen G-Protein abhängigen Signaltransduktionswege nach GPCRs-Aktivierung.	5
Abb. 3: Mögliche G-Protein-unabhängige Signaltransduktion und GPCR-Internalisierung.	7
Abb. 4: Optische Bildgebung von Tumoren nach Applikation von fluoreszenzmarkiertem Octreotid bzw. Octreoscan®.	9
Abb. 5: Orexin-System: Rezeptoren und Liganden.	11
Abb. 6: Funktion von Orexin.	17
Abb. 7: Ausdehnung des Primärtumors (T).	20
Abb. 8: Beispielmessung und Auswertung einer durchflusszytometrischen Analyse von HT-29 Zellen mittels PI-Färbung.	38
Abb. 9: FRET Prinzip des LANCE cAMP Assays.	41
Abb. 10: BIND® Technologie.	42
Abb. 11: Beispielmessung und Auswertung einer Durchflusszytometrischen Analyse von transient mit dem OXR1 transfizierten Hek293a-Zellen.	45
Abb. 12: Validierung des OXR1-Antikörpers.	50
Abb. 13: Expression des OXR1 im humanen Gewebe.	52
Abb. 14: Expression des OXR1 im humanen Gewebe.	53
Abb. 15: Expression des OXR1 in humanem Tumorgewebe und Normalgewebe des Magens.	55
Abb. 16: Expression des OXR1 in humanem Tumorgewebe und Normalgewebe des Dünndarms.	56
Abb. 17: Expression des OXR1 in humanem Tumorgewebe und Normalgewebe des Dickdarms.	57
Abb. 18: Expression des OXR1 in humanem Tumorgewebe und Normalgewebe des Pankreas.	58
Abb. 19: Expression des OXR1 in humanen Ösophaguskarzinomen und im Normalgewebe des Ösophagus.	59
Abb. 20: Expression des OXR1 in humanen Ösophagus-Tumoren.	61
Abb. 21: Expression von OXR1, CK19, und Vimentin in humanem Normalgewebe und Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.	64
Abb. 22: Relative Expression des OXR1 in humanen Tumorzelllinien auf RNA-Ebene.	65
Abb. 23: Expression des OXR1 im OXR1-Klon, Hek293a-WT-Zellen, kolorektalen Tumorzelllinien und ösophagealen Tumorzelllinien.	67
Abb. 24: Expression des OXR1 in subkutanen Tumoren.	70
Abb. 25: Fluoreszenzbildgebung einer Kyse 180 A) und einer HT-29 B) tumortragenden Nacktmaus.	71
Abb. 26: Einfluss von OXA auf die Wachstumsrate in verschiedenen ösophagealen Tumorzelllinien.	74
Abb. 28: Einfluss von OX auf den Zellzyklus und die Apoptose in HT-29-Zellen und dem OXR1-Klon.	75
Abb. 27: Einfluss von OXA und OXB auf die Zellzahlen in HT-29.	75
Abb. 29: Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Ca ²⁺ -Mobilisierung nach Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen von OXA.	77
Abb. 30: Ca ²⁺ -Mobilisierung nach OXA-Applikation.	78
Abb. 31: Anstieg des zytoplasmatischen cAMP-Spiegels nach OXA-Applikation.	79
Abb. 32: Reduktion des zytoplasmatischen cAMP-Spiegels nach OXA-Applikation vor und während der Stimulation mit Forskolin.	81
Abb. 33: A) Konzentrationskurve für Forskolin auf den cAMP Spiegel. B) Konzentrationskurve für OXA bei der jeweiligen EC ₈₀ von Forskolin auf den cAMP-Spiegel.	82

Abb. 34: Zeit-Zellantwort-Kurven in Ösophagus-Zelllinien, HT-29-Zellen und dem OXR1-Klon nach OXA-Applikation.....	83
Abb. 35: Internalisierung von OXA-IDCC.....	85
Abb. 36: Aufnahme des OXA-IDCC.....	87
Abb. 37: Aufnahme des OXA-IDCC.....	89
Abb. 38: Aufnahme des OXA-IDCC.....	90
Abb. 39: Aufnahme des OXA-IDCC.....	91
Abb. 40: Fluoreszenzbildgebung einer HT-29-Tumor tragenden Nacktmaus.....	101
Abb. 41: Internalisierung und zelluläre Verweildauer des OXA-IDCC über 5 h im Durchflusszytometer.....	108

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der Expression des OXR1 im Menschen.....	12
Tab. 2: Übersicht der Expression der OX im Menschen.....	13
Tab. 3: Stadieneinteilung der ösophagealen Tumore nach AJCC/UICC, aufbauend auf der TNM-Klassifizierung.....	21
Tab. 4: Übersicht der verwendeten Antikörper und deren Verdünnung.....	26
Tab. 5: Übersicht der Expression des OXR1 in humanem Tumorgewebe und Normalgewebe.....	60
Tab. 6: Übersicht der Signalstärke der α OXR1-IHC-Färbung.....	63
Tab. 7: Übersicht der Expression des OXR1 in humanen Tumorzelllinien.....	68
Tab. 8: Übersicht der Fluoreszenzbildgebung mit OXA-IDCC.....	72
Tab. 9: Übersicht der IDCC positiven Zellen und deren spezifische Verdrängung in humanen Tumorzelllinien.....	92
Tab. 10: Übersicht der OXR1-Expression in humanen kolorektalen Tumorzelllinien und deren Bestätigung durch die Literatur.....	96
Tab. 11: Übersicht der Expression und Funktionalität des OXR1 in humanen Tumorzelllinien und dem OXR1-Klon.....	111

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
AP2	Clathrin Adaptoren
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinder-Serum-Albumin BSA
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CASR	<i>Calcium-sensing</i> -Rezeptor
CB1	Cannabinoid Rezeptor 1
Chem9sc	Chemerin-9 „scrambled“
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CHx	Cyckloheximid
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CT	Computertomografie
C-Terminus	Carboxyterminus
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Effektive Konzentration bei halbmaximaler Aktivierung
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGFP	hellere grün fluoreszierende Protein
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
EL	extrazellulärer Loop
ENS	enterisches Nervensystem
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
ESCC	<i>esophageal squamous cell carcinoma</i>
EZD	Extrazelluläre Domäne
FAM	6-Carboxy-Fluoreszin
FCS	Fetales Kälberserum
G418	Geneticin 418
GABA	metabotroper GABA-Rezeptor
GAPs	GTPase-aktivierende Proteine
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDI	<i>guanin nucleotid dissociation inhibitors</i>
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guanine Nukleotide Austauschfaktor
GEP-Tumor	gastropankreatischer Tumor
GFP	grün fluoreszierende Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GRK	GPCR regulatorische Kinase
GRP	<i>gastrin releasing peptide</i>
GTP	5'-Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's Salt Solution</i>
HCL	Salzsäure
Hek293a	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure

Hif1 α	<i>hypoxia-inducible factor-1</i>
HUVECs	humanen Endothelzellen
i.c.v	intrazerebroventrikular
IDCC	7-Diethylamino-3-(((2-iodoacetamido)ethyl)amino)carbonyl)coumarin
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IL	intrazellulärer Loop
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
i.v.	intravenös
IZS	Intrazelluläreschleife
kDa	Kilodalton
Kyse180	Plattenepithelkarzinom Zellen
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minuten
ml	Milliliter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NETs	Neuroendokrine Tumore
NIR	Nahinfrarot
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-Terminus	Aminosterminus
nu/nu	Naktmaus
OX	Orexin

OXA	Orexin A
OXB	Orexin B
OXR	Orexinrezeptor
PA	<i>phosphatidic acid</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positionen-Emissions- Tomographen
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PP	pankreatisches Polypeptid
PPO	Präpro-Orexin
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RGS	<i>regulator of G-Protein signaling</i>
Rho	Ras homolog
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RIN38	<i>Ratten Insulinoma Zelllinie</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
s.c.	Subkutan
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	Src Homologiedomäne 2
SHP-2	<i>SH2-containing tyrosin phosphatase</i>
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatinrezeptor
Tab	Tabelle

TAE	Tris Acetat EDTA
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TAS1	<i>Taste</i> Rezeptoren
TMD	Transmembrandomänen
TNF α	<i>tumor necrosis factor-alpha</i>
TR-FRET	<i>Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurat
UV	ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Wiedenmann bedanken, an dessen Klinik die vorliegende Arbeit angefertigt wurde. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Mutzel für die Bereitschaft zur Tätigkeit als Gutachter.

Ich möchte mich besonders bei Dr. Carsten Grötzinger für die Betreuung und Unterstützung meiner Promotion bedanken. Danke für das interessante Thema und für die Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an alle ehemaligen und aktuellen Mitglieder der AG Tumortargeting: Dr. Anja Klußmeier, Dr. Sebastian Bandholtz, Cordula Dierkes, Ines Eichhorn, Yvonne Giesecke, Jan Lennart Körner, Annett Rexin, Dr. Celiné Schäfer, Dr. Quirino Schefer, Claudia Schuldt und Dr. Petra Schulz.

Ganz spezieller Dank geht an:

Ines Eichhorn für die Unterstützung bei den Gewebefärbungen; Yvonne Giesecke für die Hilfe bei zellkulturtechnischen Problematiken, Anja Klußmeier für die Messungen am InCell; Sebastian Bandholz für die Messungen am FLIPR; Cordula Dierkes und Petra Schulz für alle „Maus“ Experimente; Celiné Schäfer für die Einführung in die Taqman-Technik; Quirino Schefer für die Beantwortung all meiner spontanen, merkwürdigen und manchmal unüberlegten Fragen.

Besonders danke ich Petra Schulz, Celiné Schäfer und meinem Papa für das Korrekturlesen dieser Arbeit und hilfreiche Diskussionen und Anmerkungen.

Für die Geduld, die motivierenden lieben Worte und für das Gefühl geliebt und aufgefangen zu werden danke ich meiner Familie, meinen „Mädels“, meiner Tochter und ihrem Papa und allen, die an mich geglaubt haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der aufgeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Ich erkläre außerdem, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Berlin, 27.03.2012

_____ (Bianca Bolewski)