

Aus der Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von Stress- und Peptidhormonen bzw. Chemerin und
Chemerinrezeptoren in der Tumorbilogie des kolorektalen
Karzinoms

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Friebus-Kardash, Justa

aus Kratowo

Datum der Promotion: 14.02.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung/Abstract.....	4
2. Einleitung.....	6
2.1 Das kolorektale Karzinom.....	6
2.2 Regulation von Tumorwachstum und –metastasierung.....	7
2.2.1 Klassische Wachstumsfaktoren.....	8
2.2.2 Hormone.....	8
1.2.2.1 Rolle von Stresshormonen in der Tumorbologie des kolorektalen Karzinoms.....	11
2.2.3 Peptide.....	12
2.2.3.1 Rolle von gastrointestinalen Peptiden in der Tumorbologie des kolorektalen Karzinoms.....	13
2.2.3.1.1 Neurotensin.....	14
2.2.3.1.2 Glukagon-like peptide-2 (GLP-2).....	15
2.2.3.1.3 Somatostatin.....	16
2.3 Chemerin.....	16
2.3.1 Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1-vermittelte Effekte.....	17
2.3.2 Chemokine-(C-C Motiv)-Rezeptor 2 (CCRL2)-vermittelte Effekte.....	18
2.3.3 Rolle von Chemerin für die Tumorproliferation.....	18
2.4 Zielstellungen der Arbeit.....	19
3. Methodik.....	21
3.1 Zellkultur.....	21
3.2 DAPI-Proliferationsassay.....	21
3.2.1 Zellaussaat.....	21
3.2.2 Substanzzugabe.....	22
3.2.3 DAPI-Färbung.....	23
3.3 Human Tumor Colony Forming Assay (HTCA).....	24
3.4 ITCC-Internalisierungsassay.....	25
3.4.1 Internalisierung.....	25
3.4.2 Proteinbestimmung nach der BCA-Methode.....	26
3.4.3 Auswertung des ITCC-Internalisierungsassays.....	26

3.4.4 Internalisierung im Verdrängungsversuch.....	26
3.5 Tierversuche.....	27
3.5.1 Versuchstiere und ihre Haltung.....	27
3.5.2 <i>In-vivo</i> -Bildgebung von Chemerin-9 in tumortragenden Tieren.....	27
3.5.3 Verdrängungsversuch.....	28
3.5.4 Behandlungsversuch.....	28
3.6 Histologische Färbungen.....	29
3.6.1 HE-Färbung.....	29
3.7 Immunhistochemische Färbungen.....	30
3.7.1 CD31-Färbung.....	30
3.7.2 Ki67-Färbung.....	31
3.8 Immunfluoreszenz.....	32
3.8.1 CD45-Färbung.....	32
3.9 Statistische Analyse.....	32
4. Ergebnisse.....	33
4.1 Etablierung des DAPI-Proliferationsassays.....	33
4.2 Screening zur Untersuchung des Proliferations-effektes von Stresshormonen und Peptiden.....	42
4.3 <i>In-vitro</i> -Internalisierung von Chemerin-9.....	48
4.4 <i>In-vivo</i> -Bildgebung der Chemerin-9-Aufnahme.....	54
4.5 Behandlungsversuch mit Chemerin-9.....	57
5. Diskussion.....	68
5.1 Der positive Einfluss von Stresshormonen und Peptiden auf das kolorektale Tumorstadium <i>in vitro</i>	68
5.1.1 Proliferative Wirkung von Stresshormonen auf die kolorektalen Tumorzellen.....	68
5.1.2 Proliferative Wirkung von gastrointestinalen Peptiden auf die kolorektalen Tumorzellen.....	72
5.2 Chemerin-9 stimuliert Tumorstadium <i>in vitro</i>	79
5.3 Aktivierung von CMKLR1 durch Chemerin-9.....	83
5.4 Chemerin-9 stimuliert das kolorektale Karzinomwachstum <i>in vivo</i>	89
5.5 Ausblick.....	94
6. Literatur.....	96
7. Abkürzungsverzeichnis.....	105

Eidesstattliche Versicherung.....	107
Lebenslauf.....	108
Danksagung	110

1. Zusammenfassung

Wachstum und Metastasierung kolorektaler Tumore werden durch klassische Wachstumsfaktoren gesteuert. Welche Rolle dabei Hormone, wie Stress- bzw. gastrointestinale Peptidhormone, spielen, wird zurzeit aktiv erforscht und ist auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit, wobei das Chemerin eine zentrale Rolle während dieser Studie einnimmt. Das Plasmaprotein Chemerin sowie sein Derivat mit Peptidstruktur Chemerin-9 besitzen unterschiedliche Funktionen im menschlichen Organismus. Als ein Chemokin ist Chemerin unter anderem in den Inflammationsprozess involviert und induziert die Adipo- und Angiogenese. Der Beitrag von Chemerin zur kolorektalen Kanzerogenese ist bisher nicht charakterisiert worden. In einem Screeningverfahren wurde die proliferative Wirkung von Stresshormonen Dexamethason und Noradrenalin sowie Peptiden Neurotensin, GLP-2, Somatostatin-Analogon SOM230 und Chemerin-9 untersucht. Dazu wurde DAPI-Proliferationsassay für drei humane kolorektale Adenokarzinomzelllinien (HCT116-luc, HT29-luc, SW620-luc) etabliert. Alternativ wurde der Effekt der 6 Substanzen auf die Koloniebildung im HTCA erfasst. Die Behandlung mit Chemerin-9 und Dexamethason führte zur signifikanten Zellzahlzunahme in allen drei Tumorzelllinien. GLP-2, Noradrenalin und Neurotensin steigerten die Tumorzellproliferation in maximal zwei Zelllinien. Dexamethason förderte auch die Koloniebildung bei allen drei Zelllinien, Chemerin-9, Noradrenalin und Neurotensin bei einer bzw. zwei Zelllinien. Die Vermittlung des *in-vitro*-Proliferationseffektes von Chemerin-9 über den G-Protein-gekoppelten Chemerinrezeptor CMKLR1 wurde mithilfe des ITCC-Internalisierungsassays verifiziert. Es wurden in den 5 von insgesamt 12 untersuchten Adenokarzinomzelllinien (SW480, HCT116-luc, HT29-luc, Colo320, LS174T) und einer Neuroblastomzelllinie (SK-N-AS) die Bindung und nachfolgende Internalisierung der ITCC-Fluoreszenzfarbstoff-markierten Chemerin-9-Variante nachgewiesen. Im Verdrängungsversuch zum Spezifitätsnachweis von der über den CMKLR1 vermittelten Chemerin-9-Internalisierung wurde eine geringgradige Signalabschwächung in den SW480, HT29-luc und SK-N-AS beobachtet. Zusätzlich wurde die Chemerin-9-Aufnahme in die subkutanen Tumore tragende Nacktmäuse mithilfe der *in-vivo*-Nahinfrarotbildgebung dargestellt. Der anschließende Behandlungsversuch mit der stabilen Chemerin-9-Variante demonstrierte ein Ansteigen des Tumolvolumens und -gewichtes in den HCT116-luc- und HT29-luc-Tumoren. Die vorliegende Arbeit lieferte einen ersten Hinweis auf die Bedeutung von Chemerin-9 als Wachstumsfaktor für das kolorektale Tumorwachstum *in vitro* und *in vivo* und brachte damit Anhaltspunkte für Strategien zur Therapie des kolorektalen Karzinoms mithilfe von Chemerinrezeptor-Antagonisten.

1. Abstract

The growth of colon tumors and development of metastases are regulated by classic growth factors. The role of hormones like stress hormones and gastrointestinal peptides in this process is currently under investigation and represents the subject of this work, in which chemerin takes a key role. The plasma protein chemerin and its derivative chemerin-9 have different functions in the human organism. As a chemokine chemerin is involved among other things in inflammation process and induces adipo- and angiogenesis. The link between chemerin and colon cancer genesis has not been characterized, so far. In the present study, we studied the effect of the stress hormones dexamethasone and norepinephrine and the peptides neurotensin, GLP-2, somatostatin-analogue SOM230 and chemerin-9 on tumor cell proliferation in a screening approach. For that purpose we established a DAPI-proliferation assay for three human colon cancer cell lines (HCT116-luc, HT29-luc, SW620-luc). Alternatively we recorded the effect of these 6 substances on formation of tumor colonies in a HTCA. The treatment with chemerin-9 and dexamethasone led to significant increase of the cell number in all three cancer cell lines. GLP-2, norepinephrine and neurotensin raised cancer cell proliferation in maximal two cell lines. Dexamethasone promoted also colony formation in all three cell lines, chemerin-9, norepinephrine and neurotensin in one or two cell lines. The effect of chemerin-9 on tumor growth *in vitro* through the G protein-coupled receptor, CMKLR1, was verified with the help of ITCC-internalization assay. We detected binding and following internalization of chemerin-9 variant marked with ITCC-fluorescence dye in 5 of 12 colon cancer cell lines (SW 480, HCT116-luc, HT29-luc, Colo320, LS174T) and one neuroblastoma cell line (SK-N-AS). In competitive experiments a small signal reduction was observed in SW480, HT29-luc and SK-N-AS referring to the specificity of chemerin-9 internalization translated through CMKLR1. In addition we showed chemerin-9 accumulation in nude mice bearing subcutaneous tumors by *in vivo* near infrared imaging. A following treatment study with stable chemerin-9 variant demonstrated an increase of tumor volume and weight in HCT116-luc and HT29-luc tumors. The present study provides the first data of the importance of chemerin-9 as a potent growth factor for the colon cancer growth *in vitro* and *in vivo*. Chemerin receptor antagonists may therefore be considered in the development of antiproliferative strategies for therapy of colorectal cancer.

2. Einleitung

2.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom umfasst alle malignen Primärtumorerläsionen im Bereich des gesamten Dickdarmes und des Enddarmes. Weltweit nimmt es den dritten Platz auf der Liste der durch maligne Tumore hervorgerufenen Todesfälle ein - nach dem Prostata- und Lungenkarzinom bei Männern und nach dem Brust- und Bronchialkarzinom bei Frauen (1). Das kolorektale Karzinom tritt in der Allgemeinbevölkerung bei Personen, die älter als 50 Jahre sind, häufiger auf. Lediglich 10 % aller kolorektalen Karzinome beruhen auf einer genetischen Prädisposition und sind mit hereditären Tumorsyndromen wie den Polyposis-Syndromen (z. B. familiär adenomatöse Polyposis- FAP) und den nicht polypösen Syndromen (z. B. hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom- HNPCC) assoziiert (2). Die übrigen 90 % sind sporadischer Natur. Bestimmte Lebensstil- und Umweltfaktoren stehen mit einem erhöhten Risiko für das kolorektale Karzinom in Verbindung, z. B. ein hoher Prokopfverbrauch von Kalorien, Verzehr von tierischen Fetten und Fleisch, hohe Serumcholesterinspiegel sowie Nikotinkonsum (3). Die Insulinresistenz, die häufig mit Übergewicht einhergeht, zeichnet sich durch hohe Spiegel von Insulin und dem Wachstumsfaktor, Insulin-like Growth Factor Type I (IGF-1), aus, was zur verstärkten Proliferation der Dickdarmschleimhaut führt und die Neoplasieentstehung fördert (2, 4). Auch die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn mit ihrer hohen regenerativen Aktivität steigern das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (5). Eine ballaststoff-, kalzium- und vitaminreiche Diät gilt ihrerseits als protektiv (4).

Als eine präkanzeröse Vorläuferläsion für das kolorektale Karzinom kann das polypöse Adenom betrachtet werden (6). Allerdings entartet nur ein geringer Teil der Adenome in invasive Karzinome. Der Entartungsprozess folgt dem Prinzip der Adenom-Karzinom-Sequenz, welche einen mehrstufigen Übergang der gesunden Kolonschleimhaut in ein kolorektales Karzinom durch ein Aneinanderreihen von genetischen Mutationen in den Onkogenen und den Tumorsuppressorgenen präsentiert. Die Kanzerogenese ereignet sich also in mehreren Schritten. Am Anfang kommt es zum Verlust des Tumorsuppressorgens APC (adenomatous Polyposis coli), anschließend zur Aktivierung des Onkogens K-ras durch eine Punktmutation, dann zur Deletion des so genannten Deleted in Colorectal Cancer (DCC)-Gens, das für einen Tumorsuppressor kodiert. Am Schluss fällt das Tumorsuppressorgen p53 aus, was in einer uneingeschränkten Proliferation der Kolonepithelien mündet (4). Die entstandenen Tumore wachsen in rund 50 % der Fälle im Rektum und zu 25 % im Sigma. Die meisten kolorektalen

Tumore besitzen die Histologie eines Adenokarzinoms, das tubuläre, villöse oder sogar muzinöse mit einer ausgedehnten extrazellulären Schleimproduktion einhergehende Formen annehmen kann. Es existieren aber auch seltenere histologische Varianten des Darmkrebs wie das kleinzellige, medulläre bzw. undifferenzierte Karzinom oder das Siegelringkarzinom (6).

Kolorektale Karzinome wachsen langsam und werden erst im fortgeschrittenen Stadium symptomatisch. Das klinische Bild ist stark abhängig von der Tumorlokalisation (7). Die Tumore im Kolon ascendens fallen durch flüssige Stühle, lokale Schmerzen, Erbrechen und Appetitlosigkeit auf. Die malignen Raumforderungen des rechten Kolonrahmens ulzerieren oft und führen zu okkulten Blutungen, die erst durch eine Eisenmangelanämie auf sich aufmerksam machen. Tumore, die im linken Kolon descendens sitzen, behindern die Stuhlpassage und gehen mit Bauchkrämpfen und Veränderungen des Stuhlgangverhaltens einher, die sich in dem Wechsel von Diarrhoen und Obstipationen äußern. Karzinome des Rektosigmoids manifestieren sich mit schleimigen und blutigen Stühlen, Tenesmen sowie Bleistiftstühlen.

Eine Früherkennung des lokalisierten oberflächlichen kolorektalen Karzinoms bei einem asymptomatischen Patienten ermöglicht eine verbesserte Heilungsrate. Die Leitlinien zum Screening des kolorektalen Karzinoms empfehlen für die gesunde Bevölkerung ohne Risikofaktoren eine jährliche digital rektale Untersuchung und einen jährlichen Hämokkulttest sowie eine Koloskopie alle 10 Jahre ab dem 50. Lebensjahr (2). Die Patienten, bei denen ein adenomatöser Polyp bereits entdeckt und entfernt wurde, tragen ein vielfach höheres Risiko ein Karzinom zu entwickeln, sodass sie sich regelmäßigen engmaschigen Kontrollen mittels Koloskopie unterziehen sollten. Es ist vor allem die Größe des Polypen als einer prämaligen Veränderung, welche über das Entartungspotenzial bestimmt.

Weitere Faktoren, die die Kanzerogenese des kolorektalen Karzinoms vorantreiben, sind Gegenstand aktueller Forschung. In den folgenden Abschnitten wird der Einfluss solcher Botenstoffe wie Stresshormone und gastrointestinaler Peptide auf die Entstehung und das Wachstum des Kolonkarzinoms erläutert.

2.2 Regulation von Tumorwachstum und –metastasierung

Die Prozesse des Tumorwachstums und der Metastasierung werden im Allgemeinen durch eine Vielzahl von unterschiedlichen molekularen Mediatoren reguliert, die mehreren Substanzklassen zugeordnet sind. Auf der einen Seite sind es die klassischen Wachstumsfaktoren, die am besten erforschten an der Tumorprogression beteiligten Substanzen. Auf der anderen Seite zählen dazu auch andere Botenstoffgruppen wie Hormone verschiedener chemischer Natur, Zytokine und Arachidonsäurederivate.

2.2.1 Klassische Wachstumsfaktoren

Es existiert eine Reihe von unterschiedlichen klassischen Wachstumsfaktoren, zu denen EGF, IGF-1/2, FGF, TGF bzw. PDGF gehören. Diese Wachstumsfaktoren werden entweder vom tumorassoziierten Bindegewebe oder von den entarteten Tumorzellen selbst im Sinne der autokrinen Sekretion teilweise in hohen Mengen produziert. Allen diesen Proteinen ist gemeinsam, dass ihre Wirkung auf die Tumorphiliferation durch die Bindung an einen membranständigen Wachstumsfaktorrezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität entfalten (8). Die extrazelluläre Domäne eines Tyrosinkinaserzeptors ist für die Ligandenbindung zuständig und die intrazelluläre Domäne besitzt eine Kinaseaktivität. Nach der Anlagerung des Wachstumsfaktors findet eine Dimerisierung der benachbarten Rezeptoren statt, welche der Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne dient. Dadurch ist Tyrosinkinase in der Lage die Kinasedomäne des benachbarten Rezeptors im Rahmen eines Autophosphorylierungsvorganges zu phosphorylieren. Die entstandenen phosphorylierten Tyrosinkinasereste repräsentieren spezifische Bindungsstellen für weitere Proteine, die die durch den entsprechenden Wachstumsfaktor eingeleitete Signaltransduktionskaskade vermitteln. Einerseits sind es Proteine, die über eine SH2-Domäne verfügen und darüber mit der zytosomatischen Tyrosinkinase Src oder mit der Phospholipase C interagieren. Andererseits besitzen die aktivierten Tyrosinkinasereste eine hohe Affinität für das Protein namens Grb2, das mit seiner anderen freien Seite an das Protein Sos bindet (9). Sos verlagert das Gleichgewicht zwischen GDP-Ras und GTP-Ras zu Gunsten des aktiven GTP-Ras, welches verschiedene Proteinkinasen einzuschalten vermag. Diese Proteinkinasen beteiligen sich alle nach der Aktivierung an dem Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-(MAP-Kinase)-Signalweg. Das Endziel des MAP-Kinaseweges besteht in der Aktivierung der intranukleären Transkriptionsfaktoren. Die Transkriptionsfaktoren kontrollieren ihrerseits die Expression der Zellproliferationsgene und führen eine Zellantwort im Sinne des Tumorwachstums herbei.

Oftmals kann man eine Koexpression von Rezeptoren für mehrere unterschiedliche Wachstumsfaktoren auf einer Tumorzelle antreffen (10). Die Wachstumsfaktor-Tyrosinkinaserzeptoren wie z. B. EGFR, IGF-I-R und HER-2 stehen in enger Interaktion miteinander und koordinieren auf diese Art das Malignitätsverhalten einer Tumorzelle, sodass eine Resistenzentwicklung gegen die spezifischen auf den anti-EGFR- bzw. anti-HER-2-Rezeptorantikörpern bzw. -inhibitoren basierenden Therapien auftreten kann (11, 12).

2.2.2 Hormone

Hormone sind chemische Botenstoffe, die von endokrinen Drüsen bzw. Gewebe produziert und in die Blutbahn freigesetzt werden, sodass sie auf dem Weg ihren den für sie spezifischen Rezeptor tragenden Erfolgsorgan erreichen. Die Hormonfreisetzung kann aber außer über die Blutbahn auch über andere Wege gehen. Es gibt die parakrine Sekretion, bei der das Gewebshormon über Diffusion in das Intestinum des Zielorgans oder zu benachbarten Zellen gelangt. Alternativ kann ein Hormon im Rahmen einer autokrinen Freisetzung auf seine Mutterzelle zurückwirken (9). Jede Hormonsekretion unterliegt einem endokrinen Regelkreis, wobei beim Vorliegen eines Hormonüberschusses die Hormonproduktion per negative Rückkopplung herunterreguliert und an den Sollwert angepasst wird.

Als die bekanntesten Beispiele für die Tumorstadiumregulation mittels Hormone sind solche hormonabhängigen Tumore wie das Mamma-, Endometrium- bzw. Prostatakarzinom zu nennen, die unter dem Einfluss der Geschlechtshormone, Östrogene, Gestagene bzw. Testosteron proliferieren und eine erhöhte Anzahl an intranukleären Geschlechtshormonrezeptoren aufweisen. So spielen z. B. Gestagen und Östrogen eine entscheidende Rolle in der Ätiologie des Mammakarzinoms (13). Sie wirken mitogen und induzieren die Transkription der das Tumorstadium steuernden Gene in den Mammakarzinomen, bei denen der positive Östrogen-/Gestagenrezeptorstatus immunhistochemisch nachweisbar ist. Dazu binden die weiblichen Geschlechtshormone an die entsprechenden intrazellulären Rezeptoren und es kommt zur Dimerisierung zweier Hormonrezeptorkomplexe, die die Bindung des entstandenen Dimers an die DNA im Bereich der Östrogen-/Gestagen-Response-Elements mit einer Transkriptionsfaktorenaktivierung erlaubt. Die im heutigen klinischen Alltag weit verwendeten Hormontherapieverfahren wirken den die Tumorstadiumprogression stimulierenden Östrogeneffekten entgegen. Der selektive Östrogenrezeptormodulator, Tamoxifen, bildet mit dem in dem Mammakarzinom überexprimierten intrazellulären Östrogenrezeptor einen Komplex und antagonisiert die Transkription der östrogenregulierten Gene. Eine weitere Möglichkeit zur Inhibition der östrogenabhängigen Tumorstadiumproliferation stellen die Aromatase-Inhibitoren dar, die selektiv die Umwandlung des Testosterons in Estradiol hemmen und somit die Östrogenspiegel im Blut senken. Eine postmenopausale Hormonersatztherapie ist dagegen mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebsentstehung vergesellschaftet (13).

Chronischer Stress kann viele physiologische Funktionen des menschlichen Organismus negativ beeinflussen und verursacht eine vermehrte Freisetzung von Stresshormonen. Unter dem Begriff der Stresshormone verbergen sich das Glukokortikoidhormon Cortisol und die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Es wird eine Beziehung zwischen chronischem Stress, der neuroendokrinen Reaktion darauf und der Tumorstadiumbiologie vermutet (14). Jedoch ist das Wissen

darüber, inwiefern die körpereigenen Stresshormone das Tumorwachstum und –metastasierung modulieren, zu heutigen Zeitpunkt noch sehr begrenzt.

Cortisol wird von der Zona reticularis der Nebennierenrinde produziert und ist der Hauptvertreter der Glukokortikoide. Seine Ausschüttung wird durch die pulsative Freisetzung des Cortikotropins, ACTH, aus dem Hypophysenvorderlappen reguliert. Die ACTH- und somit auch die Cortisolsekretion richten sich nach einem bestimmten Tag-Nacht-Rhythmus, sie erfolgen in zwei- bis dreistündigen Episoden und besitzen ihr Maximum morgens, zwischen 6 und 8 Uhr. Zahlreiche Patientenstudien demonstrierten erhöhte Serum- bzw. Speichelcortisolspiegel bei Patienten, die von verschiedenen soliden, nicht hormonabhängigen Tumoren wie Nierenzell-, Lungen-, Pankreas-, Magen- und Kolonkarzinom, betroffen waren, im Vergleich zum gesunden Patientenkollektiv (15-17). Außerdem wurde bei Tumorpatienten oft eine fluktuierende vom physiologischen Tag-Nacht-Rhythmus abweichende circadiane Rhythmik der Cortisolsekretion beobachtet (18, 19). Die festgestellte Dysregulation auf der Ebene der Hypothalamus-Hypophysen-Achse mit verändertem bzw. aufgehobenem circadianem Cortisol-Rhythmus und einer vermehrten Cortisolsekretion waren mit einer schlechteren Prognose, einem höheren Tumorstadium sowie einer früheren Mortalität assoziiert. In einigen *in-vivo*- und *in-vitro*-Experimenten gab es Indizien für einen die Tumorproliferation stimulierenden Effekt des hochpotenten Cortisol-Analogons Dexamethason auf die Tumore diverser Tumorzelllinien (20-25). Bei allen untersuchten Tumorzelllinien wurde eine signifikante Glukortikoidrezeptorexpression detektiert, was die Spezifität der über den Glukortikoidrezeptor transformierten proliferativen Wirkung von Cortisol nahelegt. Die Mechanismen und Signalwege, über die die Tumorprogression anregende Wirkung von Cortisol vermittelt wird, sind weitestgehend ungeklärt. Es ist zu vermuten, dass neben der bereits bekannten Suppression der gegen die malignen Zellen gerichteten Immunabwehr ein direkter Einfluss von Cortisol über seinen Glukortikoidrezeptor auf das Tumorwachstum ursächlich sein kann.

Eine weitere Stresshormonklasse repräsentieren die Katecholamine, zu denen vor allem Noradrenalin und Adrenalin gehören. Noradrenalin wird in hohe Mengen von den postganglionären Neuronen des Sympathikus abgegeben. Noradrenalinproduktion findet zusätzlich neben der Adrenalinbildung in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks statt, wobei berücksichtigt werden muss, dass Adrenalin und Noradrenalin im Verhältnis 4:1 synthetisiert werden. Von Noradrenalin ist bekannt, dass es entsprechend den Ergebnissen vieler *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien in die Tumorpathogenese involviert ist. Die Behandlung mit Noradrenalin oder seinem Analogon Isoproterenol triggerte das Tumorwachstum in Ovarial-, Lungenadeno-, Plattenepithel- und Prostatakarzinomzelllinien (22, 24-28). Der $\beta_{1/2}$ -Rezeptor-

Antagonist Propanolol beseitigte die beschriebenen Noradrenalin-Effekte auf die Tumorproliferation und unterstrich damit die Rolle des β -Rezeptors für das durch Stress induzierte Tumorwachstum. In zwei Ovarialkarzinomzelllinien gelang der Nachweis der an die Zugabe von Noradrenalin bzw. seiner Analoga gebundene Produktion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der einen wichtigen Beitrag zur Tumorangiogenese und somit Tumorprogression leistet (29). Noradrenalin war auch in der Lage das invasive Potenzial von Ovarialkarzinomzellen *in vitro* zu steigern, indem es die Bildung der für das Eindringen von Tumorzellen in die extrazelluläre Matrix verantwortlichen Metalloproteasen, MMP-2 und MMP-9, vorantrieb (30). Die Isoproterenol-Injektion in die mit den Ovarialkarzinomzelllinien inokulierten Nacktmäuse erbrachte ebenfalls einen fördernden Effekt auf das Tumorwachstum *in vivo* sowie die Infiltration des umgebenden Gewebes. Der proliferative Effekt von Noradrenalin ist also vor allem der Stimulation von Angiogenese und der verbesserten Tumolvaskularisierung geschuldet und wird über den β -adrenergen, G-Protein-gekoppelten Rezeptor realisiert. Nach der β -Rezeptor-Aktivierung durch Noradrenalin wird der cAMP-Proteinkinase-A-Signalweg in Gang gesetzt und es werden die Gene für VEGF und Metalloproteasen vermehrt abgelesen (14, 31). Interessanterweise konnte in einigen Patientenstudien gezeigt werden, dass die Einnahme von β -Rezeptorblockern vor dem Hintergrund einer antihypertensiven Therapie das Risiko für Krebserkrankungen, unter anderem für das Prostatakarzinom, reduzierte (32, 33).

2.2.2.1 Rolle von Stresshormonen in der Tumorbologie des kolorektalen Karzinoms

Chronischer Stress resultiert bekanntermaßen in erhöhten Konzentrationen der körpereigenen Stresshormone wie Cortisol und Adrenalin bzw. Noradrenalin und nimmt möglicherweise einen Einfluss auf die Entstehung und Verlauf von vielen Erkrankungen, unter anderem von Krebs. Der begünstigende Effekt der Stresshormone auf die Tumorgenese wird durch die Suppression der Immunantwort auf die neu entstandenen neoplastischen Zellen begründet. In den letzten Jahren begann man allerdings auch andere durch Stresshormone vermittelte biologische Signalwege für die Tumorentstehung, unter anderem eine direkte Wirkung der Stresshormone auf die Proliferation der malignen Zellen, in Betracht zu ziehen (14).

In Bezug auf den Zusammenhang zwischen Cortisol und Wachstum des kolorektalen Karzinoms spaltete sich die Forschungswelt in zwei getrennte Lager. Die einen Forscher behaupteten, dass Cortisol und seine synthetisch hergestellten Analoga die Proliferation des kolorektalen Karzinoms vorantrieben. Die anderen unterstützten die Hypothese eines antiproliferativen Effektes von Cortisol. Mit Gewissheit kann man zunächst davon ausgehen, dass eine Mehrzahl der untersuchten Resektate der kolorektalen Tumore von Patienten über zytoplasmatische

Glukokortikoidrezeptoren verfügten. So waren 63 % der von 22 brasilianischen Patienten entnommenen kolorektalen Tumoren positiv für Glukokortikoidrezeptoren (34). Beim Vergleich der Glukortikoidrezeptorexpression zwischen dem kolorektalen Tumorgewebe und dem gesunden Kolongewebe stellte sich heraus, dass die Expression im Karzinomgewebe höher war als im Normalgewebe (54 % versus 38 % im Rektum und 78 % versus 56 % in Kolon). Daneben konnte die Arbeitsgruppe um Grandall Alford bei 23 % von allen untersuchten Kolonkarzinomproben das Vorhandensein von Glukokortikoidrezeptoren dokumentieren (35). Diese Daten werden in der Literatur als Hinweise auf einen direkten Einfluss von Cortisol als Glukokortikoidrezeptor-Ligand auf die Kontrolle des malignen Transformationsprozesses des kolorektalen Karzinoms gedeutet (36). Diese Vermutung bestärken die Resultate einiger Patientenstudien, die signifikant höhere Cortisolspiegel im Blut der Patienten, die am kolorektalen Karzinom litten, als bei gesunden Probanden detektierten und eine Assoziation zwischen dem erhöhten Serumcortisolwert und Tumorprogression andeuteten (37, 38). Allerdings mangelt es an Daten dazu, wie Noradrenalin bzw. Adrenalin speziell beim kolorektalen Karzinom in den Tumorwachstumsprozess eingreifen.

2.2.3 Peptide

Als weitere die Tumorproliferation und Metastasierung steuernde Substanzen sind Hormone mit Peptidstruktur anzuführen. Beispielsweise besitzt die Mehrzahl der im Gastrointestinaltrakt vorkommenden Hormone eine Peptidstruktur. Maligne Tumore des Gastrointestinaltraktes verfügen über Rezeptoren für die gastrointestinalen Peptide wie z.B. Neurotensin, Gastrin oder Cholecystikinin und sprechen auf die Behandlung mit diesen GI-Peptiden in Form einer Tumorwachstumserhöhung an (39).

Es ist schon lange bekannt, dass Magenkarzinom unter der Kontrolle des Peptidhormons Gastrin wächst. Die höchsten Gastrinmengen werden von den G-Zellen in der antropylorischen Mukosa sezerniert. Gastrin steuert im gesunden Magen die Salzsäurefreisetzung, kann aber auch den malignen Prozess in der Magenschleimhaut unterhalten. Es wurden in *in-vivo*-Versuchen bereits neue Therapiestrategien mit dem Ziel der Reduktion des Gastringehaltes zur Vorbeugung der Gastrin-getriggerten Magenkarzinomprogression getestet (40). Mäusen, die an Gastrinrezeptor-positiven Magentumoren litten, wurden Gastrinrezeptor-Antagonisten bzw. Prostaglandinderivate wie z. B. Enprostil, das die Gastrinsekretion in die Blutbahn herunterregulieren sollte, verabreicht. Diese Therapieansätze konnten das Tumorwachstum in den Mäusen verlangsamen oder sogar stoppen. In die Regulation der Kanzerogenese des Bauchspeicheldrüsenkrebses sind mehrere gastrointestinale Peptide gleichzeitig involviert.

Einige Peptide tragen einen stimulatorischen und andere hingegen einen inhibitorischen Charakter (39). So erwiesen sich Cholecystokin (CCK) und Neurotensin als hoch wirksame Wachstumsfaktoren in den *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien zur Untersuchung der trophischen Effekte dieser Peptide auf das Pankreaskarzinom. Beide Peptide sind vor allem in den endokrinen Zellen des Dünndarmes und in dem peripheren Nervensystem des GI-Traktes anzutreffen. Somatostatin aus den D-Zellen des Pankreas und der Magen- bzw. Darmmukosa fungierte dagegen als ein antiproliferatives Agens bei der Genese des Pankreaskarzinoms. Außer dem unmittelbaren über den Somatostatin-Rezeptor vermittelten Tumorwachstum hemmenden Effekt werden einige andere indirekte Wirkungen wie Inhibition der Angiogenese oder Suppression der Freisetzung klassischer Wachstumsfaktoren dem Somatostatin zugeschrieben (41, 42).

Gastrointestinale Peptide übernehmen laut neuen experimentellen Daten die Regulation des Tumorwachstums auch in außerhalb des GI-Traktes befindlichen Tumoren, wie z. B. Brust-, Prostata-, Lungenkarzinom und Neuroblastom (39). Beispielsweise im Fall vom Neuroblastom vermochte Somatostatin die Tumorprogression dieser Hirntumorentität zu bremsen. Das Fehlen funktioneller Somatostatin-Rezeptoren auf der Neuroblastomzelloberfläche war aus diesem Grund ein Indikator für eine schlechte Prognose (43, 44).

Die Vermittlung des durch die oben besprochenen gastrointestinalen Peptidhormone generierten Wachstumssignals in die Tumorzellen erfolgt durch die Bindung des Peptids an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) auf der Tumorzellmembran und die Induktion des entsprechenden Signaltransduktionsweges (39). Zu den multiplen durch die Peptid-GPCR-Interaktion aktivierten Zielmolekülen und Signalwegen werden z. B. cAMP (3'-5'-cyclo-Adenosinmonophosphat), Proteinkinase A-CREB (cyclic AMP response elements Bindeprotein), Kalzium-Proteinkinase C, Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) sowie cJun N-Kinase gezählt. Die Mehrheit der intrazellulären Signalwege führt zu der MAP-Kinase (45). Nach Phosphorylierung wird die MAP-Kinase in den Zellkern transloziert, wo sie mit Transkriptionsfaktoren interagiert und die Transkription der die Kanzerogenese kontrollierenden Gene auslöst.

2.2.3.1 Rolle von gastrointestinalen Peptiden in der Tumorbologie des kolorektalen Karzinoms

Gastrointestinale Peptide gehören zu den Hormonen, die von den endokrin aktiven Zellen der Bauchspeicheldrüse und der intestinalen Mukosa produziert werden. Sie erfüllen physiologische Funktionen im Gastrointestinaltrakt wie zum Beispiel Regulation der Sekretion, Motilität sowie Absorption und Verdauung der aufgenommenen Nährstoffe. Einige gastrointestinale Peptide

sind zusätzlich in der Lage, die Proliferation des gesunden Bauchspeicheldrüsen- sowie Mukosagewebes anzuregen (39). Es ist jedoch aus mehreren Studien bekannt, dass gastrointestinale Hormone auch an dem Wachstum maligner Tumore teilhaben.

Im Falle des kolorektalen Karzinoms wurden proliferative, durch unterschiedliche gastrointestinale Peptide verursachte Effekte registriert (39). Zu den am besten erforschten Peptiden mit einer Wachstumswirkung auf das kolorektale Karzinom zählt Gastrin. Es beeinflusst positiv das Tumorwachstum in den *in-vitro*- sowie *in-vivo*-Experimenten (46). Es besteht eine Korrelation zwischen der Gastrinrezeptorexpression und dem Stadium des kolorektalen Karzinoms (47). Ergänzend zum Gastrin wurden auch andere gastrointestinale Peptidhormone in Hinsicht auf ihre die Tumorproliferation stimulierende Wirkung verifiziert. Im Folgenden wird die Rolle der drei Peptide, Neurotensin, Glukagon-like peptide-2 (GLP-2) und Somatostatin, bei der Kanzerogenese und Progression des kolorektalen Karzinoms erläutert.

2.2.3.1.1 Neurotensin

Neurotensin ist ein Tridekapeptid, das einerseits vom Zentralnervensystem, insbesondere dem Hypothalamus und der Hypophyse, und andererseits von den endokrinen N-Zellen des Gastrointestinaltraktes gebildet wird. Zunächst wird die inaktive Vorläuferform des Neurotensins, Präproneurotensin, freigesetzt, welches in das Neurotensin 1-13 und in ein weiteres Peptid, Neuromedin N, gespalten wird. Lediglich die abgespaltenen Aminosäuren 9-13 stellen die biologisch aktive Form des Neurotensins dar. Die Neurotensin produzierenden N-Zellen befinden sich überwiegend im Jejunum und Ileum und beantworten den intraluminalen Anstieg von Fettsäuren mit einer Erhöhung ihrer Aktivität. Das sezernierte Neurotensin erfüllt mehrere Funktionen im Gastrointestinaltrakt. Es stimuliert die Pankreassekretion, senkt die Magen- und Dünndarmmotilität und erleichtert die Aufnahme von Fettsäuren in die Dünndarmmukosa (39). Außerdem ist Neurotensin am Wachstum verschiedener Gewebe des Gastrointestinaltraktes, wie Pankreas-, Magen-, Kolon, und Dünndarmgewebe, beteiligt (48-51). Allerdings spielt Neurotensin auch eine Rolle für das Wachstum nicht nur gesunder, sondern auch neoplastischer gastrointestinaler Gewebe (39). Insbesondere beim kolorektalen Karzinom wurden dem Neurotensin geschuldete Proliferationseffekte vermehrt beobachtet. Es wurde die Expression des Neurotensinrezeptors NTSR1 in der gesunden Kolonmukosa, im Kolonadenom sowie Kolonkarzinom auf mRNA-Ebene angeschaut und miteinander verglichen (52). Dabei stellte sich heraus, dass das Kolonkarzinom eine viel höhere Expressionrate als die gesunden Kolonepithelzellen besaß. Das Karzinomgewebe exprimierte auch mehr NTSR1 auf seiner Oberfläche als das Adenomgewebe, was die Schlussfolgerung nahe legte, dass der Anstieg der

Neurotensinrezeptoren mit dem Prozess der neoplastischen Transformation bzw. Tumorentstehung im Kolon zusammenhängen könnte. Mit Neurotensin behandelte kolorektale Tumorzelllinien reagierten in dieser Studie mit einem signifikanten Anstieg der Zellzahl im Vergleich zur Negativkontrolle, was auf eine stimulatorische Wirkung von Neurotensin auf das Tumorstadium *in vitro* hinweist. Außerdem erwies sich Neurotensin als ein wirksamer trophischer Faktor für das Tumorstadium *in vivo*, indem es die Progression des kolorektalen Karzinoms in zahlreichen Maus- bzw. Rattenmodellen stimuliert (53).

Die beschriebenen Proliferationseffekte von Neurotensin werden durch unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden vermittelt. Dazu bindet Neurotensin an seinen spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor NTSR1 und aktiviert darüber eine ganze Reihe von verschiedenen Proteinkinasen, die ihrerseits mit den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) in Kontakt treten und nach weiteren Signaltransduktionsschritten den Übertritt in die Mitose-Phase, die DNA-Synthese und somit die Tumorzellvermehrung realisieren (54).

2.2.3.1.2 Glukagon-like peptide-2 (GLP-2)

Glukagon-like peptide-2 gehört zur Gruppe der Enteroglukagone, die aus den L-Zellen des Ileums und Kolons sezerniert werden. Den stärksten Stimulus für GLP-2-Freisetzung in den Blutkreislauf stellt die Nahrungsaufnahme dar. Das freigesetzte GLP-2 beteiligt sich an der Absorption und Verdauung von Nahrungsbestandteilen (55). Der Abbau des im Blutkreislauf zirkulierenden GLP-2 erfolgt durch die Spaltung mittels des Enzyms Dipeptidylpeptidase (DPP)-VI (56). Außerdem zeichnet sich GLP-2 durch eine proliferative Wirkung auf die gesunden Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes aus. Es fördert das Wachstum der Kryptenepithelien, vor allem im Dünndarm und unterbindet die Apoptosevorgänge in den Krypten und Villi (57, 58). Demzufolge wird die funktionelle Mukosaoberfläche vergrößert und die Nährstoffabsorption verbessert. Es wurden auch indirekte intestintrophische Effekte von GLP-2 beobachtet, zu denen die klassischen, von den GLP-2-Rezeptor tragenden subepithelialen Myofibroblasten produzierten Zellwachstumsfaktoren wie IGF-1 und 2, KGF und Erb-Liganden beitragen (59, 60).

Die Rolle des GLP-2 bei der Proliferation und Metastasierung des kolorektalen Karzinoms wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite liegen *in-vitro*-Studien vor, in denen einige kolorektale Tumorzelllinien nach der GLP-2-Zugabe eine erhöhte Proliferationsrate zeigten (61). In anderen Untersuchungen des *in-vitro*-Wachstumseffektes von GLP-2 konnten keine Veränderung des Tumorstadiumsverhaltens nach der GLP-2-Applikation festgestellt werden (62). Die *in-vivo*-Studien konnten ebenfalls keine eindeutige Antwort auf die Frage nach dem kanzerogenen

Potenzial von GLP-2 liefern. In einigen durch unterschiedliche kanzerogene Substanzen induzierten Kolonkarzinommodellen bestand eine Assoziation zwischen der GLP-2-Behandlung und der Zunahme von neoplastischen Formationen. Andere *in-vivo*-Daten sprachen gegen eine durch das GLP-2 verursachte Modulation des kolorektalen Tumorwachstums *in vivo* (62). Daraus wird es ersichtlich, dass die Rolle von GLP-2 an der Induktion bzw. Progression des kolorektalen Karzinoms nicht endgültig geklärt ist und weiterer intensiver Forschung bedarf.

2.2.3.1.3 Somatostatin

Es existieren verschiedene Isoformen des Somatostatins mit unterschiedlicher Aminosäureanzahl und biologischer Wirkungspotenz. Das Somatostatin stammt aus den Neuronen des Zentral- und peripheren Nervensystems. Es ist unter anderem auch in dem autonomen Nervensystem des Gastrointestinaltraktes auffindbar. Die endokrinen D-Zellen des Pankreas, Magen und Darmes sind ebenfalls in der Lage Somatostatin zu produzieren (63, 39). Die Hauptaufgabe dieses Peptids besteht in der Inhibition der Wirkung diverser Hormone. Er ist der universelle Antagonist für das Wachstumshormon Somatomedin sowie für eine Vielzahl von gastrointestinalen Hormonen (64). Somatostatin hemmt auf diese Weise die Magenmotilität und Salzsäuresekretion aus dem Magen, die Freisetzung der pankreatischen Enzyme sowie des Bikarbonats und die intestinale Nährstoffabsorption. Zusätzlich wird die Proliferation des gesunden Gewebes im Gastrointestinaltrakt durch Somatostatin gestoppt (65).

Bezüglich des kolorektalen Tumorwachstums entfaltet Somatostatin und seine Analoga ebenfalls eine inhibitorische Aktivität und hemmen die Tumorprogression *in vitro* wie auch *in vivo*. Die Applikation eines Somatostatinrezeptoragonisten, Octreotid, sorgte für die Verstärkung der Apoptose in den Tumoren (39, 66).

2.3 Chemerin

Chemerin ist ein Plasmaprotein, das durch die Spaltung des aus 163 Aminosäuren zusammengesetzten Vorläuferproteins Pro-Chemerin in seine aktive Form überführt wird (67, 68). Das aktive Chemerin fungiert als ein Chemokin und beteiligt sich am Entzündungsgeschehen. Ob Chemerin eine pro- oder antiinflammatorische Wirkung zeigt, hängt davon ab über welche Proteaseklasse das Vorläuferprotein für Chemerin an seinem C-Terminus prozessiert wird (69). Wenn die Spaltung des Pro-Chemerins durch die aus den neutrophilen Granulozyten freigesetzte Serinprotease im Rahmen der Entzündungs-, Gerinnungs- bzw. Fibrinolysekaskade erfolgt, entfaltet Chemerin seine proinflammatorischen Eigenschaften (70). Die aktivierten Makrophagen produzieren ihrerseits die Cysteinprotease, welche dafür sorgt,

dass das dadurch entstandene aktive Peptid Chemerin-15 inhibitorisch in die Entzündungskaskade eingreift und die Sekretion der proinflammatorischen Mediatoren dämpft (71).

Im Allgemeinen übt Chemerin multimodale Funktionen im menschlichen Organismus aus. Dazu bindet es an einen der drei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, nämlich den Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1), den Chemokine-(C-C Motiv)-Rezeptor 2 (CCRL2) bzw. den GPR1 (72-74). Chemerin-9 ist ein Peptid, das aus 9 Aminosäuren besteht und aus der weiteren Serinproteasespaltung am C-Terminus des aktiven Chemerins stammt. Das Nonapeptid, Chemerin-9, verfügt analog zum Chemerin über eine hohe Affinität für den Chemerinrezeptor, CMKLR1 (75).

2.3.1 Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1)-vermittelte Effekte

Der Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) wird auf einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert. Dazu gehören unter anderem Makrophagen, unreife dendritische Zellen und die den Oberflächenmarker CD56 tragende „Natural killer“ (NK)-Zellen (76). Durch die Interaktion mit dem CMKLR1 steuert Chemerin die Migration von Makrophagen und dendritischen Zellen, stimuliert die Makrophagenadhäsion an solche Proteine der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und VCAM-1, verstärkt die Phagozytose und reguliert schließlich die Zytokinausschüttung (72, 77, 78). Es wurde ein agonistischer Effekt des Peptids, Chemerin-9, auf den CMKLR1 in Bezug auf chemotaktische, entzündungsfördernde Wirkung detektiert (75). Zudem wurde CMKLR1-Expression auf den Osteoklasten, Mundepithelzellen, Adipozyten und Endothelzellen nachgewiesen (72). Das Ausschalten der Gene für Chemerin bzw. den CMKLR1 in den 3T3-L1 Adipozyten resultierte in der Hemmung der Adipozytenreifung. Chemerin ist also in der Lage über die Bindung an den CMKLR1 die Adipogenese sowie den Fettzellmetabolismus, unter anderem den Glukosestoffwechsel, zu beeinflussen (79, 80). Es hat zusätzlich einen aktivierenden Effekt auf die Angiogenese (81).

Die Bindung des Chemerins an seinen Rezeptor CMKLR1 geht mit der Aktivierung der Zellen und der Induktion einer Signaltransduktionskaskade einher. Es kommt infolgedessen zum verstärkten intrazellulären Kalziumfluss (69). Es sind auch intrazelluläre Signalmoleküle wie Syk, ERK1/2, Akt, p38MAPK oder PI3-K in den Signaltransduktionsprozess inbegriffen (72).

Der G-Protein gekoppelte Chemerinrezeptor GPR1 ähnelt sehr von seiner chemischen Struktur aus gesehen dem CMKLR1 (69, 82). GPR1 ist ebenfalls ein funktioneller Rezeptor mit hoher Affinität für Chemerin, der zur Internalisierung nach Agonistenbindung befähigt ist.

2.3.2 Chemokine-(C-C Motiv)-Rezeptor 2 (CCRL2)-vermittelte Effekte

Ein weiterer Chemerinrezeptor, der Chemokine-(C-C Motiv)-Rezeptor 2 (CCRL2), wurde auf unterschiedlichen menschlichen hämatopoetischen Zellen, wie Monozyten, dendritische Zellen, T-Lymphozyten, Natural killer-Zellen, aber vor allem in der Mehrzahl auf den Mastzellen gefunden (83, 84). Der CCRL2-Rezeptor unterscheidet sich von dem funktionellen Chemokinrezeptor CMKLR1 insofern, dass er unfähig ist die Zellen nach der erfolgten Chemerinbindung zu aktivieren und eine Signalkaskade in das Zellinnere weiterzuleiten. Denn dem CCRL2-Rezeptor fehlt das für eine Signaltransduktion notwendige DRYLAIV-Motiv in der zweiten intrazellulären Schleife (72).

Die Aufgabe des nicht funktionellen, stillen CCRL2 besteht möglicherweise in der Zusammenarbeit mit dem CMKLR1. Die mit dem CCRL2 beladenen Zellen binden an die N-terminale Domäne des bioaktiven Chemerins. Es könnten dadurch hohe Chemerinmengen lokal konzentriert werden, um auf diese Weise die C-terminale Domäne von Chemerin dem funktionellen CMKLR1 von Nachbarzellen effizient zu präsentieren und eine mit dem intrazellulären Kalziumfluss verbundene Signalkaskade in den CMKLR1-tragenden Mastzellen zu triggern, die in eine IgE-Antikörper abhängige Mastzellanaphylaxie mündet (69, 85). Über den beschriebenen CCRL2-Mechanismus würde so die Bindung von Chemerin an den CMKLR1 der umgebenden Zellen im Grunde erleichtert und der Inflammationsprozess dadurch amplifiziert.

2.3.3 Rolle von Chemerin für die Tumorproliferation

Der Einfluss von Chemerin auf die Tumorentstehung und –progression bzw. die Expression der drei bekannten G-Protein-gekoppelten Chemerin-Rezeptoren CMKLR1, CCRL2 und GPR1 im neoplastischen Gewebe waren bisher nicht charakterisiert worden.

2.4 Zielstellungen der Arbeit

Der Prozess des Tumorwachstums und -Metastasierung unterliegt der Regulation durch unterschiedliche Substanzklassen. Seit langer Zeit ist die Tumorzellproliferation stimulierende Wirkung von klassischen Wachstumsfaktoren bekannt. Der positive Einfluss der Hormone auf die Tumorzellproliferation ist für einige Tumorentitäten wie das Mamma- oder Prostatakarzinom gut dokumentiert und die Hemmung des direkten Wachstumseffektes von verantwortlichen Geschlechtshormonen wird für therapeutische Zwecke eingesetzt. In den letzten Jahren weckte die Frage nach der Rolle der körpereigenen Stresshormone für die Tumorbiologie das Interesse der Forscher aus aller Welt. Es mehrten sich die Hinweise darauf, dass erhöhte Stresshormonspiegel mit Tumorprogression und schlechterer Prognose bei Tumorkranken in Verbindung stünden. Zahlreiche Studien berichteten von den durch die Stresshormonausschüttung ausgelösten Veränderungen der zellulären Immunität. Einige Forschungsgruppen nahmen jedoch eine direkte, vom Immunsystem unabhängige, Wirkung der Stresshormone auf das Tumorzellwachstum an, wobei die dahinter stehenden Mechanismen unzureichend verstanden wurden. Zusätzlich wurde der proliferative Effekt auf neoplastisches Gewebe einer anderen Hormongruppe, der gastrointestinalen Peptidhormone, vor einigen Jahren identifiziert. Auf der Basis der zusammengefassten Erkenntnisse zur Rolle von Hormonen und Peptiden für die Kanzerogenese sollte ursprünglich folgende Frage geklärt werden:

1. Welchen Einfluss haben Stresshormone und Peptide auf das Wachstum kolorektaler Tumorzellen?

Zur Untersuchung der Frage sollte das kolorektale Adenokarzinom als eine hormoninaktive Modelltumorentität dienen und es sollten drei unterschiedliche kolorektale Adenokarzinomzelllinien dafür verwendet werden. In einem Screeningverfahren sollte der proliferative Effekt von zwei Stresshormonen, Dexamethason und Noradrenalin und von vier Peptiden, Neurotensin, GLP-2, SOM230 (stabilisiertes Somatostatinanalogon) und Chemerin-9 untersucht werden. Das Screening sollte mit zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Methoden erfolgen. Einerseits sollte im Human Tumor Colony Assay die stimulierende Wirkung der aufgezählten Substanzen auf die Koloniebildung der Tumorzellen beurteilt werden. Andererseits musste ein für höheren Durchsatz geeigneter Proliferationsassay etabliert werden. Anhand der Ergebnisse aus der ersten Fragestellung ergaben sich im Folgenden weitere Fragestellungen:

2. Übt Chemerin-9 einen stimulierenden Effekt auf die Tumorzellproliferation und -koloniebildung des kolorektalen Adenokarzinoms aus?

Diese Fragestellung sollte im Rahmen eines Substanzscreenings unter Nutzung des DAPI-Proliferationsassays und des Human Tumor Colony Forming Assays für drei kolorektale Tumorzelllinien beantwortet werden.

3. Wird fluoreszenzmarkiertes Chemerin-9 vermehrt in kolorektale Adenokarzinomzellen und *in-vivo*-Tumore aufgenommen?

Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollte ein Internalisierungsassay entwickelt werden, mit dessen Hilfe es gelingen sollte die Bindung des an den ITCC-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Chemerin-9 an den endogenen Chemerinrezeptor CMKLR1 und seine nachfolgende Aufnahme ins Zellinnere der kolorektalen Adenokarzinomzellen unterschiedlicher Zelllinien nachzuweisen. Zum anderen sollte an subkutan implantierten Tumoren im Nacktmausmodell die *in-vivo*-Aufnahme von Chemerin-9 mittels der Nahinfrarot-Bildgebung registriert werden.

4. Welchen Einfluss hat die Behandlung mit Chemerin-9 auf das kolorektale Adenokarzinomwachstum *in vivo*?

Zur Bearbeitung dieser Frage sollte ebenfalls ein Xenograft-Nacktmausmodell benutzt werden. Damit sollte der Einfluss von Chemerin-9 auf das Tumorwachstum *in vivo* in einem Behandlungsversuch untersucht werden, wobei einerseits ein Tumorwachstum fördernder Einfluss von Chemerin auf die Tumorzellen im dreidimensionalen Gewebekomplex, andererseits auch eine Tumorproliferation hemmende Wirkung von Chemerin aufgrund der proinflammatorischen und immunstimulierenden Eigenschaft von Chemerin als einem Chemokins denkbar wären. Deshalb sollten die Unterschiede zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe an den Tumorgewebeschnitten in Hinblick auf den Vaskularisierungsgrad, die Proliferationsfraktion, Nekrosezeichen und Lymphozyteneinwanderung herausgearbeitet werden.

3. Methodik

3.1 Zellkultur

Alle untersuchten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien wurden bei der ECACC bzw. ATCC erworben. Die luc-Klone der Zelllinien HT29 und HCT116 wurden bei Caliper gekauft und die Zelllinie SW620 wurde mit dem Luziferase-Gen in unserem Labor transduziert. Die Zelllinien Colo320, Colo205, LS174T, SW480, SW620, SW620-luc und DLD1 wurden mit dem 10 % fötales Kälberserum (Biochrom AG, DE) ergänzten RPMI 1640-Medium (Biochrom AG, DE) kultiviert. Die weiteren Tumorzelllinien wie HCT116-luc, HT29, HT29-luc, SK-N-AS und U2OS wurden mit dem 10 % fötales Kälberserum (FCS) und 1 % L-Glutamin (Gibco, USA) enthaltenden McCoy's5A Modified-Medium (Biochrom AG, DE) behandelt. Für die Zellkultur der kolorektalen Zelllinien Caco2 sowie Mia-PaCa-2 wurde das DMEM-Medium (Biochrom AG, DE) mit dem Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum und der Zelllinie T84 das DMEM/Ham's F-12-Medium 1:1 (Biochrom AG, DE) mit dem Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum verwendet. Die Kultivierung der mit dem Chemerin-9- bzw. Sekretinrezeptor transfizierten Zellklone, U2OS-CKLMR1, Mia-PaCa-2-CKLMR1 und U2OS-STCR erfolgte mit dem für die Wildtypzelllinie verwendeten Medium, das mit Zeocin (c=0,4 mg/ml, Invitrogen, USA) und G418 (c=0,4 mg/ml, Biochrom AG, DE) zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes supplementiert wurde. Alle Tumorzelllinien wurden im Inkubator (Labotect, DE) bei 37 °C in einer CO₂-Konzentration von 5 % kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert.

3.2 DAPI-Proliferationsassay

Der DAPI-Proliferationsassay wurde mit dem Ziel der direkten quantitativen Zellzahlbestimmung entworfen. Mit Hilfe dieses Assays sollte der die Tumorzellproliferation stimulierende Effekt von Stresshormonen und Peptiden auf die kolorektalen Adenokarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Der Assay setzte sich aus mehreren Bestandteilen zusammen.

3.2.1 Zellaussaat

Nach dem Erreichen von einem Konfluenzgrad von 60-70 % wurden die Tumorzellen trypsinisiert (Trypsin/EDTA Solution, Biochrom AG, DE) und auf eine 96-well-Platte (Becton Dickinson, USA) ausgesät. Dazu wurden die Zellen nach dem Absaugen des Kulturmediums mit PBS (PBS Dulbecco, Biochrom AG, DE) gewaschen und 5 min bei 37 °C trypsinisiert. Zur Trypsinneutralisation wurden die Zellen in Medium mit 10 % FCS resuspendiert. Davon wurden

40 µl der Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer zur Zellzählung aufgetragen. Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Heraeus Instruments, DE) und nach dem Dekantieren des Überstandes in serumfreiem Medium auf 10.000 Zellen pro 100 µl Medium eingestellt. Anschließend erfolgte die Zellaussaat auf die 96-well-Platte, wobei je 100 µl mit 10.000 Zellen pro well pipettiert wurden. Nach der Aussaat wurde die Platte sofort in den Inkubator gestellt.

3.2.2 Substanzzugabe

Substanzen: Insulin like growth factor-1, human recombinant (Sigma-Aldrich, UK), Dexamethason (Sigma-Aldrich, UK), Norepinephrine (Sigma-Aldrich, UK), Lys8Lys9-Neurotensin 8-13 (Bachem, Schweiz), GLP-2Gly2 (peptides&elephants GmbH, DE), SOM230 (Novartis, Schweiz), CG36 (peptides&elephants GmbH, DE). Zur Herstellung der Stock-Lösungen wurde eine 50 %-ige DMSO-Lösung (Sigma-Aldrich, UK) bzw. steriles Wasser (Fresenius Kabi, France) verwendet.

1 h nach der Zellaussaat wurden zu den ausgesäten Zellen die zu untersuchenden Substanzen, inklusive Negativ- und Positivkontrolle, in einem Volumen von 100 µl pro well zugegeben. Für die Erzeugung der Negativkontrolle wurde entsprechend den Ergebnissen der im nächsten Abschnitt beschriebenen Etablierung das Medium einer für jede Zelllinie individuell ermittelten FCS-Konzentration (0,6 %, 0,8 % oder 1,6 % FCS) verwendet und 12 wells der ausgesäten Platte wurden mit 100 µl von diesem Medium behandelt. Da die Tumorzellen in 100 µl serumfreien Medium bereits gelöst waren, wurde von einer 1:2-Verdünnung ausgegangen und es wurde deshalb das Doppelte der ermittelten FCS-Konzentration (1,2 %, 1,6 % oder 3,2 % FCS) im Medium für die Negativkontrolle eingesetzt. Zur Herstellung der Positivkontrolle wurde das 10 % FCS enthaltende Medium benötigt und es wurden 100 µl davon pro well auf 12 wells verteilt. Wegen oben erwähnten, aus der Zellaussaat resultierenden 1:2-Verdünnung musste für die Positivkontrolle ebenfalls die doppelte FCS-Konzentration genommen werden.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden in dem der Negativkontrolle entsprechenden Medium gelöst, wie im **Schema 1** exemplarisch gezeigt ist. Es wurde eine Verdünnungsreihe der Substanzen aufgestellt, aus der 4 verschiedene Substanzkonzentrationen resultierten. Die Lösung mit der höchsten Ausgangskonzentration der Substanz wurde in 1:10-Schritten verdünnt. Allerdings mussten die 4 Konzentrationen bei der Substanzvorbereitung wegen der schon angesprochenen, durch die Zellaussaat entstandenen 1:2-Verdünnung verdoppelt werden. Es wurden 6 wells mit einer Substanzkonzentration behandelt. Unter der Berücksichtigung der

Methodik

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dexamethason 1 nM (2 nM)						Dexamethason 10 nM (20 nM)					
Dexamethason 100 nM (200 nM)						Dexamethason 200 nM (400 nM)					
Noradrenalin 0,01 nM (0,02 nM)						Noradrenalin 0,1 nM (0,2 nM)					
Noradrenalin 1 nM (2 nM)						Noradrenalin 10 nM (20 nM)					
Neurotensin 0,1 nM (0,2 nM)						Neurotensin 1 nM (2 nM)					
Neurotensin 10 nM (20 nM)						Neurotensin 100 nM (200 nM)					
Negativkontrolle 0,8 % FCS (1,6 % FCS)											
Positivkontrolle 10 % FCS (20 % FCS)											

Schema 1 Beispiel der Belegung einer 96-well-Platte für die Substanzzugabe

Kapazität einer 96-well-Platte konnten auf diese Weise 3 unterschiedliche Substanzen parallel unter Verwendung einer gemeinsamen Negativ- bzw. Positivkontrolle getestet werden.

Die Versuchsdauer betrug 96 Stunden. Der Medium- bzw. Substanzwechsel fand aufgrund der kurzen Halbwertszeit einiger der getesteten Substanzen alle 24 Stunden zur derselben Uhrzeit statt. Dazu wurden nur 100 µl pro well von insgesamt sich in jedem well nach der Substanzzugabe befindenden 200 µl für die gesamte Platte abgenommen und es erfolgte die erneute Zugabe von 100 µl pro well der Positiv- bzw. Negativkontrolle sowie von 100 µl pro well der frisch angesetzten Substanz in 4 verschiedenen Konzentrationen.

3.2.3 DAPI-Färbung

Nach 96 Stunden wurde der durch die Substanzbehandlung hervorgerufene Effekt auf die Zellzahl mithilfe der DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Für den DAPI-Proliferationsassay wurde den Etablierungsergebnissen folgend die zweite DAPI-Färbeprotokollversion benutzt. Dafür wurden die Zellen in einer 4 %-igen PFA-Lösung (Herbeta Arzneimittel, DE), die direkt ins Medium pipettiert wurde, für 10 min fixiert. Danach wurden die Zellen einer 10 minütigen DAPI-Färbung (DAPI c=5 mg/ml (Sigma-Aldrich, UK) in 0.1 %-igen Triton-Lösung (Merck, DE)) unterzogen. Zur Beseitigung der nicht gebundenen DAPI-Lösungsreste wurde die 96-well-Platte 2 x mit PBS gewaschen. Bei der letzten Wäsche wurde PBS in der Platte belassen. Die Platte wurde zugedeckt und im Kühlschrank bei 4° C (Liebherr, DE) bis zur Messung gelagert. Bei dem zuvor im Rahmen der Etablierung durchgeführten ersten DAPI-Färbeprotokoll handelt es

sich um eine ursprünglich untersuchte längere Version. Bei der Version wurde zunächst das Medium aus der 96-well-Platte abgeworfen und die Platte wurde im Anschluss 1 x mit PBS gewaschen. Danach wurde die Platte mit 4 %-iger PFA-Lösung fixiert und einer DAPI-Färbung mit der mit 0.1 %-iger Triton-Lösung 1:10000 verdünnten DAPI-Lösung in der Ausgangskonzentration von 5 mg/ml für 10 min unterzogen. Am Ende wurde die Platte 2 x mit PBS gewaschen, wobei beim 2. Mal 100 µl PBS in der Platte behalten wurden. Die Zellkernzahl wurde mithilfe der automatisierten Mikroskopie mit dem Gerät IN-Cell Analyzer (GE Healthcare, UK) bestimmt.

3.3 Human Tumor Colony Forming Assay (HTCA)

Zur Verifizierung der die Koloniebildung verstärkenden Wirkung von Stresshormonen bzw. Peptiden auf die kolorektalen Adenokarzinomzelllinien wurde der HTCA durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in einer Flasche ausgesät und für 3 Tage bis zum Erreichen von 70 % Konfluenz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert, im serumfreien Medium resuspendiert und mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden 4 ml einer Zellsuspension vorbereitet, die 30.000 Zellen pro 1 ml des FCS-freien Mediums enthielt. Parallel wurde eine β -Mercaptoethanol-Lösung hergestellt. Dazu wurden in 8,45 ml PBS 5 µl 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, UK) gelöst und sterilfiltriert. Außerdem wurden in der Zeit die Methylcellulose-Aliquots (Sigma-Aldrich, UK) im Wasserbad (Julabo, DE) bei 37 °C vorgewärmt. Unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturbank wurde eine Mischung aus 3,6 ml Methylcellulose, 2,7 ml FCS, 60 µl Mercaptoethanol-Lösung, 770 µl Iscove's Medium (Biochrom AG, DE) und 300 µl der bereits vorbereiteten Zellsuspension in einem Röhrchen angesetzt. Das Röhrchen wurde zur besseren Durchmischung kräftig 5 min geschüttelt, bis der Ansatz eine rosa Farbe annahm. Danach wurde der Ansatz mit 1,63 ml des in der Mikrowelle (Bosch, DE) vorher aufgekochten und im serumfreien Medium gelösten Agars (Difco Laboratories, USA) versetzt, wiederholt kräftig geschüttelt und für 20 min in den Zellinkubator gestellt. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 ml des entstandenen Zellansatzes mit einer Insulinspritze (BD Medical, France) auf einer kleinen 3,5-cm-Zellkulturschale mit Raster gleichmäßig und unter Vermeidung der Luftblasenbildung verteilt. Pro im HTCA zu testende Substanz wurden insgesamt drei kleine Zellkulturschalen (2 mm grid, Nalge Nunc International, USA) mit dem Zellansatz gefüllt und auf eine große Zellkulturschale platziert, die vorher mit einer kleinen mit PBS gefüllten Schale zur Vermeidung der Austrocknung des Ansatzes bestückt wurde. Am nächsten Versuchstag wurde jeder Zellansatz mit 100 µl der auf die Stimulation der Koloniebildung zu untersuchenden Substanz behandelt. Die Negativkontrolle bestand aus der

äquivalenten Behandlung mit 100 µl Medium, das eine für die zu untersuchende Zelllinie festgelegte FCS-Konzentration enthielt. Jede Substanz wurde im Medium der der Negativkontrolle entsprechenden FCS-Konzentration gelöst. Dexamethason wurde in der Konzentration 200 nM, Noradrenalin 1 µM und alle anderen Peptide in der Konzentration 100 nM verabreicht. Danach erfolgte einmal täglich die Substanz- bzw. Negativkontrollzugabe, wobei nur 10 µl zu jedem Ansatz zugegeben wurden. Die großen Zellkulturschalen mit den Ansätzen wurden 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Am letzten Versuchstag wurden die Tumorzellkolonien bei definierter Größe von mindestens 20 Zellen pro Kolonie unter dem Lichtmikroskop (Helmut Hund GmbH, DE) bei 40-facher Vergrößerung für jeden Ansatz manuell gezählt.

3.4 ITCC-Internalisierungsassay

Zur Beurteilung der Chemerin-9-Bindung und -aufnahme in das Zellzytoplasma wurde der Internalisierungsassay gewählt. Der Assay bestand aus mehreren Abschnitten.

3.4.1 Internalisierung

Für den ITCC-Internalisierungsassay wurden 160.000 Tumorzellen pro well auf einer 6-well-Platte ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Nach der einstündigen Vorinkubation der Zellen im serumfreien Medium erfolgte die Zugabe des im serumfreien Medium gelösten Liganden. Beim Liganden handelte es sich um eine stabile an den ITCC-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Chemerin-9-Variante CG37 (peptides&elephants GmbH, DE), welche in der Konzentration 100 nM für 10 Minuten den Zellen verabreicht wurde. Nachher wurde die Platte mit PBS gewaschen, um den ungebundenen Liganden zu beseitigen. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 37 °C trypsiniert und anschließend zur Trypsinneutralisierung mit FCS-haltigem Medium (10 % FCS) resuspendiert, um dann in ein Eppendorfgefäß überführt zu werden, in dem sie bei 1000 Umdrehungen pro Minute 3 min zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde zur Entfernung der Mediumreste 2 x mit PBS gewaschen, mit 1x-Ladepuffer (187,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 30 % (v/v) Glycerol, 6 % (w/v) SDS, dest. Wasser) zum Zweck der Zellyse für 7 Minuten versetzt und anschließend 5 min auf 95 °C erhitzt (Thermomixer, Eppendorf, DE) und 1 min bei 10.000 Umdrehungen pro Minute herunterzentrifugiert. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe für das ITCC-Farbstoff tragende CG37 aufgestellt, das im Verhältnis 1:2 im 1x-Ladepuffer gelöst wurde. Die maximale CG37-Konzentration betrug 0,8 nM. Sie wurde 1:3 verdünnt bis man die minimale CG37-Konzentration von 0,01 nM erreichte, bei der kein CG37-Farbstoffsignal mehr detektiert werden konnte. Jeweils 8 µl des Zellysats sowie 5 µl des CG37 aus der

Verdünnungsreihe wurden auf ein 15 % PAGE-Minigel (40 % Bisacrylamid, 2 M Tris (pH 8,8), 10 % SDS, dest. Wasser, 10 % APS, TEMED) aufgetragen und 2-3 Stunden bei 80 V mittels Gelelektrophorese (Elektrophoreseapparatur für Minigele, Bio-Rad, USA, Top-Puffer (0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1 % SDS, pH 8,25), Bottom-Puffer (0,2 M Tris-HCl, pH 8,8)) aufgetrennt. Die Fluoreszenzsignaldetektion erfolgte mithilfe des Nahinfrarot-Scanners Odyssey (LI-COR, USA + Computerprogramm Odyssey 2.1) bei einer Wellenlänge von 800 nm.

3.4.2 Proteinbestimmung nach der BCA-Methode

Zur Quantifizierung der Gesamtmenge des im Zelllysats enthaltenen Proteins wurde die BCA-Methode eingesetzt. Dazu wurde zunächst aus dem im Reagenz A (Thermo Scientific, USA) 1:50 verdünnten Reagenz B (Thermo Scientific, USA) das Arbeitsreagenz auf eine 96-well-Platte pipettiert. Es wurde das Zelllysats mit der unbekanntem Proteinkonzentration bzw. der Standard (vom Labor der AG Grötzingen hergestellt durch Verdünnung der BSA-Stammlösung (Sigma-Aldrich, UK) mit $c = 10 \text{ mg/ml}$) im Verhältnis 1:20 im Arbeitsreagenz gelöst und im Anschluss im Verhältnis 1:2 mittels einer Verdünnungsreihe weiter verdünnt. Für jedes Zelllysats wurden Duplikate verwendet. Nach der nachfolgenden 30-minütigen Inkubation der 96-well-Platte bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die durch die Proteinzugabe im Vergleich zum Blank veränderte Absorption bei 562 nm mit einem Spektrophotometer (SpectraMax Plus384 Luminescence Microplate Reader, Molecular Devices, USA) gemessen. Mithilfe der Verdünnungsreihe für den mitgeführten Standard konnte eine Eichkurve erstellt und die Proteinkonzentration im Zelllysats bestimmt werden.

3.4.3 Auswertung des ITCC-Internalisierungsassays

Für die Auswertung des ITCC-Internalisierungsassays wurde am Anfang die mit dem Nahinfrarot-Scanner gemessene Fluoreszenzsignalintensität in die absolute Peptidmenge in Femtomol (fmol) umgerechnet. Die Ermittlung der absoluten Werte wurde mithilfe der Standardkurve aus der CG37-Verdünnung durchgeführt. Im Folgenden wurde die mit dem BCA Protein Assay bestimmte Proteinkonzentration im gesamten Zelllysats auf das in eine Geltasche aufgetragene Volumen von $8 \text{ } \mu\text{l}$ bezogen. Schließlich wurden zur Normalisierung der gewonnenen absoluten Peptidmengen die Absolutwerte durch die Proteinkonzentration in einer Geltasche geteilt. Man erhielt die absolute Peptidmenge pro 1 mg Totalprotein des Zelllysats in der Einheit fmol/mg, welche half, die CG37-Internalisierung in die Zelle quantitativ zu charakterisieren.

3.4.4 Internalisierung im Verdrängungsversuch

Zum Spezifitätsnachweis der CG37-Internalisierung wurde ein Verdrängungsversuch des CG37 durch eine stabile, nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Chemerin-9-Variante CG36 durchgeführt. Dazu wurden 2 Platten mit 160.000 Zellen pro well ausgesät. Die erste Platte war für die Untersuchung der Verdrängung angedacht. Die zweite Platte diente als Vergleichsplatte, in der keine Verdrängung stattfand. Die Verdrängungsplatte wurde ursprünglich für 30 min mit dem im serumfreien Medium gelösten CG36 in der Konzentration 10 μ M behandelt. Danach wurde in das serumfreie Medium zusätzlich CG37 in der Konzentration 100 nM für 10 Minuten hineingegeben. Dagegen wurde die Vergleichsplatte nur mit CG37 entsprechend dem Protokoll für den ITCC-Internalisierungsassay behandelt. Das weitere Vorgehen für die beiden Platten richtete sich nach dem im oberen Abschnitt zur Internalisierung beschriebenen Protokoll.

3.5 Tierversuche

3.5.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Es wurden weibliche athymische NMRI-Nacktmäuse (nu/nu) von der Firma Charles River, USA, für die Tierversuche verwendet. Die Haltung und Pflege der Nacktmäuse wurde von der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charite, Campus Virchow übernommen. Die Mäuse befanden sich in einer Umgebung mit kontrollierter relativer Luftfeuchtigkeit von 40-65 % und Raumtemperatur von 22 °C. Es wurden sechs Versuchstiere pro IVC-Käfig unter der Berücksichtigung des 12h-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Tiere wurden mit dem Standardfutter gefüttert und hatten freien Zugang zum Trinkwasser ad libitum.

3.5.2 *In-vivo*-Bildgebung von Chemerin-9 in tumortragenden Tieren

Zur Untersuchung der Chemerin-9-Aufnahme *in vivo* wurde ein Tierversuch entworfen, bei dem die Chemerin-9-Akkumulation in den kolorektalen Tumoren im Xenograft-Mausmodell mittels einer *in-vivo*-Nahinfrarotbildgebung dargestellt wurde. Zur Vorbereitung wurden die kultivierten Zellen der fünf unterschiedlichen zu untersuchenden kolorektalen Adenokarzinomzelllinien mit PBS gewaschen, mittels Trypsinierung vom Kulturschalenboden gelöst und in der Konzentration 5×10^6 Zellen pro 100 μ l pro Zelllinie mit serumfreiem Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension subkutan in die Flanke einer Nacktmaus injiziert. Jeder Maus wurden insgesamt zwei Tumore zweier verschiedener kolorektaler Tumorzelllinien in die beiden Flanken gesetzt. Zwei Wochen nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere einer *in-vivo*-Bildgebung unterzogen. Dazu wurden 24 h vorher 2 nmol der stabilen, an den ITCC-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Chemerin-9-Variante CG37 jeder Maus

intravenös verabreicht. Zur Bildgebung wurden die Mäuse kurzzeitig inhalativ (Gas Anesthesia System, Xenogen Bioscience, USA) mithilfe von Isofluran (Abbott, DE) narkotisiert und in den Imager (Pearl Imager, LI-COR, USA) gelegt. Zur Detektion des durch die CG37-Aufnahme hervorgerufenen Fluoreszenzsignals wurden die Aufnahmen jeweils von ventral und dorsal von jeder Maus gemacht. Die semiquantitative Auswertung der detektierten Fluoreszenzsignale im Tumor erfolgte mit dem Programm Pearl Cam Software, wobei ein Quotient (Ratio) aus dem CG37-Fluoreszenzsignal über dem Tumor und dem Hintergrundsignal (Nackenregion des Tieres) errechnet wurde.

3.5.3 Verdrängungsversuch

Um den Nachweis der spezifischen CG37-Aufnahme in die kolorektalen Tumore über den Chemerin-9-Rezeptor zu erbringen, musste ein Verdrängungsversuch angeschlossen werden. Dazu wurden eine Woche später, nach der oben aufgeführten *in-vivo*-Bildgebung den Nacktmäusen jeweils 44 nmol (gelöst in 100 µl PBS) der stabilen, allerdings keinen Fluoreszenzfarbstoff tragenden Chemerin-9-Variante CG36 intravenös injiziert. Nach 1 h folgte dieser i.v.-Injektion eine zweite mit 2 nmol des ITCC-Fluoreszenzfarbstoff-markierten CG37 pro Maus. Nach 24 h wurde die *in vivo*-Nahinfrarotbildgebung ohne nochmalige Injektion nach dem oben beschriebenen Ablauf erneut durchgeführt und analysiert.

3.5.4 Behandlungsversuch

Zur Verifizierung der das Tumorzellwachstum *in vivo* stimulierenden Wirkung von Chemerin-9 eignete sich ein Behandlungsversuch mit der stabilen Chemerin-9-Variante CG34 (peptides & elephants GmbH, DE). Für den Behandlungsversuch wurde ein Xenograft-Mausmodell für das kolorektale Karzinom verwendet. In dem Modell wurden den 12 Versuchsmäusen jeweils 5×10^6 Zellen pro 100 µl der kolorektalen Tumorzelllinie HT29-luc in die linke Flanke und 5×10^6 Zellen pro 100 µl der kolorektalen Tumorzelllinie HCT116-luc in die rechte Flanke subkutan implantiert. Das Tumorzellwachstum wurde ab dem ersten Versuchstag 1 x wöchentlich einerseits mit der Biolumineszenzbildgebung und andererseits mit der Kallipermessung verfolgt. Alle 12 Tiere entwickelten subkutane Tumore der Zelllinie HT29-luc. Für die Zelllinie HCT116-luc sind nur 11 Tumore angewachsen. Am siebten Tag wurden die 12 Tiere in zwei Gruppen mit je 6 Tieren pro Gruppe randomisiert und am achten Versuchstag wurde die Behandlung gestartet. Die Behandlung erfolgte im verblindeten Verfahren (die Versuchsbeteiligten kannten bis nach Auswertung die Zuordnung der Gruppen nicht), wobei eine Gruppe einmal täglich eine intraperitoneale Injektion von 200 µl des CG34 (n= 50 nmol) pro Maus erhielt und die andere

Gruppe äquivalent mit 200 µl Wasser pro Maus behandelt wurde. Die Therapiedauer betrug 23 Tage. Bei der zum Tumorgrößenmonitoring eingesetzten Messung (Electronic digital caliper, Powerfix, DE) wurde das Tumolvolumen ermittelt, indem zwei Tumordimensionen, Länge und Breite, mit dem Messschieber erfasst wurden und das Tumolvolumen nach der Formel $\frac{1}{2} \times (\text{Länge} \times \text{Breite}^2)$ kalkuliert wurde.

Das Biolumineszenzimaging basierte darauf, dass die das lichtgenerierende Enzym Luziferase exprimierenden Zellen der beiden kolorektalen Tumorzelllinien nach der Zugabe des Enzymsubstrats D-Luziferin (Caliper Life Sciences, USA) im Vergleich zum restlichen Mausegewebe grün aufleuchten werden. Denn das Substrat D-Luziferin wird durch die Luziferase der Tumorzellklone in Anwesenheit von Sauerstoff und ATP oxidiert. Als Nebenprodukt entsteht Licht der Wellenlänge 562 nm, das detektiert werden kann. Im Rahmen der Biolumineszenzbildgebung erhielt jede Maus 5-10 min vor dem Imaging eine intraperitoneale gewichtsadaptierte Injektion von D-Luziferin (150 µl) in der Dosis 150 µg/g Maus. Danach wurden die Mäuse in eine Isoflurannarkose gelegt und in den Biolumineszenzimagier Lumina (Xenogen Bioscience, USA) gebracht, in dem die Biolumineszenzsignal detektion stattfand. Die Expositionszeit betrug am Anfang bei kleinen Tumoren 1 min und würde mit der Zunahme der Tumorgröße im Laufe des Versuchs auf minimal 10 sec reduziert. Zur Zählung der emittierten Photonen bediente man sich des Programms Living Image 3.1. Es wurde letztendlich die Photonenausbeute in einem manuell umkreisten, dem untersuchten Tumor entsprechenden Areal bestimmt. Außerdem wurde der Gewichtsverlauf verfolgt. Dazu wurden die Mäuse 2 x wöchentlich gewogen (Waage, Sartorius Group, DE).

Am festgelegten Versuchsendpunkt, am Tag 31 wurden die 12 Versuchstiere mit Isofluran narkotisiert und mittels Genickbruch getötet. Es wurde eine Tumolvolumenbestimmung *in vivo* mithilfe der Kallipermessung der Tumore an getöteten Mäusen sowie eine Tumolvolumenbestimmung *ex vivo* mit der Messung der Länge, Breite und Höhe der in der Autopsie entnommenen Tumore mittels Messschiebers vorgenommen. Ergänzend wurde das Gewicht der bei der Autopsie gewonnenen Tumore ermittelt. Die entfernten Tumore wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C (Thermo Scientific, USA) gelagert.

3.6 Histologische Färbungen

3.6.1 HE-Färbung

Es wurden 10 µm dicke Schnitte von den kryokonservierten Tumoren aus dem Behandlungsversuch mit dem Gefriermikrotom (Reichert-Jung, DE) angefertigt. Nachdem die Kryoschnitte bei Raumtemperatur getrocknet wurden, wurden sie 10 min mit der

Hämalaunlösung (vom Labor AG Grötzingen angesetzt) gefärbt. Hämalaun ist positiv geladen. Es bindet deshalb an die negativ geladenen DNA-Bestandteile und färbt somit die Zellkerne blau. Anschließend erfolgte eine Färbung mit der Eosinlösung (Merck, DE) für 10 sec. Eosin seinerseits trägt negative Ladungen und wird von den positiven Gewebsbestandteilen wie z. B. Eiweißen gebunden. Damit wird das Zellzytoplasma rot angefärbt. Am Ende wurden die Schnitte mithilfe der Kaiser's Glyceringelatine (Merck, DE) eingedeckt. Die HE-gefärbten Kryoschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Carl Zeiss, DE) mit der 25- sowie 100-fachen Vergrößerung betrachtet.

3.7 Immunhistochemische Färbungen

3.7.1 CD31-Färbung

Zur Darstellung der Tumervaskularisierung der aus dem Behandlungsversuch stammenden Tumore der kolorektalen Adenokarzinomzelllinien HT29-luc und HCT116-luc wurde eine immunhistochemische ABC-Färbung mit dem gegen ein Endothelzellenoberflächenmolekül CD31 gerichteten Antikörper durchgeführt. Dazu wurden die 10 µm dicken Kryoschnitte mit 4 %-iger PFA-Lösung 20 min bei RT fixiert. Zur Blockade der endogenen Gewebsperoxidasen und Verhinderung der unspezifischen Umwandlung des später zugegebenen Farbstoffs AEC wurden die Schnitte mit der 0,3 %-igen H₂O₂-Lösung (Merck, DE) für 10 min inkubiert. Desweiteren wurde eine Avidin-Biotin-Blockade mit dem Avidin-Biotin-Blockierungskit (DAKO, Denmark) vorgenommen. Danach wurden die Präparate zur Beseitigung der unspezifischen Proteininteraktionen mit dem Primärantikörper mit der 2 %-igen Magermilch (Bio-Rad, USA) 30 min blockiert. Da die Tumervaskularisierung durch das Einwachsen der Mausgefäßstrukturen gewährleistet wurde, wurde als Primärantikörper ein Ratte-anti-Maus-CD31-Antikörper (BD, USA) zur Gefäßdetektion benutzt, welcher im Verhältnis 1:50 in 0,1 %-iger BSA (Sigma-Aldrich, UK)/ PBS gelöst und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert wurde. Als Negativkontrolle wurden die Schnitte anstatt mit dem Primärantikörper nur mit der 0,1 %-igen BSA-Lösung inkubiert. Im zweiten Schritt wurde auf die Schnitte der biotinylierte Kaninchen-anti-Ratte-Sekundärantikörper (DAKO, Denmark) für 30 min aufgetragen, der an den Ratte-anti-Maus-CD31-Primärantikörper binden sollte. Nach dem Spülen der Schnitte mit PBS wurde der Avidin-Biotin-Komplex (Vector, USA), bestehend aus dem biotinylierten an Avidin angebindenen Enzym, Meerrettichperoxidase, für 30 min dazugegeben. Der Avidin-Biotin-Komplex sollte sich seinerseits an den entstandenen biotinylierten Antigen-Antikörper-Komplex anlagern. Dann wurde der frisch angesetzte AEC-Entwicklungspuffer (50 mM Acetatpuffer (pH 5,0), AEC-Lösung (Sigma-Aldrich, UK), 30 %

H₂O₂) auf die Schnitte pipettiert. AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) ist ein Farbstoff, der durch die Peroxidasen aus dem AB-Komplex oxidiert wird, sodass ein roter Farbstoff entsteht. Die schrittweise Rotfärbung der Mausendothelzellen wurde unter Mikroskop verfolgt und nach 10 min durch Zugabe vom destillierten Wasser gestoppt. Zur besseren Beurteilung der Tumorstruktur wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 10 min durchgeführt. Die Schnitte wurden unter Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung angeschaut.

Außerdem wurden zur Bestimmung der Gefäßzahl in den Tumoren 3 bis 4 Blickfeldaufnahmen pro Tumorpräparat mit dem Lichtmikroskop bei 20-facher Objektivvergrößerung gemacht. In jedem Blickfeld wurden die rot angefärbten Gefäße mithilfe des Programms Image J Version 1.45 für Windows gezählt.

3.7.2 Ki67-Färbung

Zur Bestimmung der Fraktion proliferierender humaner Tumorzellen wurde die immunohistochemische ABC-Färbung mit dem Antikörper gegen Ki67 gemacht. Die 10 µm dicken Tumorkryoschnitte wurden mit 4 %-iger PFA-Lösung fixiert. Die weitere Behandlung der Präparate erfolgte entsprechend dem für die CD31-Färbung bereits beschriebenen Protokoll. Der anti-Human-Ki67-Primärantikörper (DAKO, Denmark) wurde in der Konzentration 0,0016 mg/ml auf die Schnitte aufgebracht. Zur Vorbereitung wurde der Primärantikörper jedoch mit dem Biotinylierungsreagenz (Animal Research Kit, DAKO, Denmark) für 20 min vorbehandelt, sodass Biotin sich mit dem Primärantikörper verbinden konnte. Weil der Ki67-Antikörper aus einer Maus stammte, waren Interaktionen des Antikörpers mit dem die humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen umgebenden Mausgewebe nicht auszuschließen, sodass der Primärantikörper vor der Gabe auf die Kryoschnitte zusätzlich mit dem Blockierungsreagenz (DAKO, Denmark) für 20 min versetzt werden musste. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C wurde der Avidin-Biotin-Komplex auf die Tumorgewebeschnitte für 30 min aufgetragen, die später mit AEC entwickelt wurden. Die eingesetzte Farbreaktion wurde nach der vollständigen Rotfärbung der proliferierenden Ki67 beinhaltenden Tumorzellen mittels destillierten Wassers gestoppt. Die Gegenfärbung mit Hämalaun diente der verbesserten Identifikation der nicht proliferierenden restlichen Tumorzellen, die unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung beurteilt wurden.

Im Rahmen der Auswertung wurde die Zählung der Ki67 markierten Zellen in jedem der 3 bis 4 bei 20-facher Objektivvergrößerung aufgenommenen Blickfelder mit dem Programm Image J Version 1.45 für Windows mit anschließender prozentualer Umrechnung für jedes Blickfeld durchgeführt.

3.8 Immunfluoreszenz

3.8.1 CD45-Färbung

Zum Nachweis der Mausimmunzellen im Tumorgewebe wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der den Oberflächenmarker CD45 tragenden Lymphozyten vorgenommen. Die 10 µm Kryoschnitte wurden mit Aceton (Merck, DE) 10 min bei -20 °C fixiert und im Anschluss mit 2 %-iger Magermilch für 30 min blockiert. Dann begann die Inkubation der Kryoschnitte mit dem Ratte-anti-Maus-Primärantikörper gegen CD45 (DAKO, Denmark), bei dem es sich um einen an fluoreszierenden Farbstoff (PE) gekoppelten Antikörper handelte, welcher 1:100 in 0,1 %-iger BSA/ PBS verdünnt wurde. Zur Generierung einer entsprechenden Negativkontrolle wurde eine Behandlung der Präparate mit 0,1 %-iger BSA allein durchgeführt. Um eine gute Abgrenzung der Tumorzellen von den Lymphozyten zu gewährleisten, wurden die Schnitte für 3 min mit DAPI-Lösung (Sigma-Aldrich, UK) zur Zellkernfärbung versetzt und mit 96 %-iger Ethanollösung (Herbeta Arzneimittel, DE) 2 min lang nachfixiert, anschließend im Dunkeln bei RT getrocknet und mit Elvanol (vom Labor AG Grötzinger angesetzt) eingedeckt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, DE) in der 20-fachen Objektivvergrößerung aufgenommen.

3.9 Statistische Analyse

Alle Graphen wurden mit dem Programm GraphPad konstruiert. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Microsoft Office Excel (Microsoft Office Paket) und GraphPadPrism5.03. Die Ergebnisse der Tumorgrößen- bzw. Biolumineszenzmessung aus dem Behandlungsversuch wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Alle übrigen Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert. Beim Vergleich zweier unverbundener, unabhängiger Mittelwerte miteinander wurde der Student's t-Test verwendet. Bei der Auswertung der Experimente, die mehr als zwei unabhängige Gruppen beinhalteten, wurde die one way ANOVA mit dem Newman-Keuls-Post-Test zur Varianzanalyse eingesetzt. Die Daten vom Tumorgrößenmonitoring mit der Kallipermessung und Biolumineszenzbildgebung sowie von der quantitativen Ki67-Bestimmung wurden mit der two way ANOVA, gefolgt vom Bonferroni-Post-Test analysiert, wobei der Einfluss der zwei kategorialen unabhängigen Variablen, der Behandlung und Kontrolle auf eine abhängige Variable untersucht wurde. Als Signifikanzgrenze wurde für alle Versuche $p < 0,05$ angesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung des DAPI-Proliferationsassays

Die erste Fragestellung der Doktorarbeit befasste sich mit dem möglichen Tumorwachstum fördernden Effektes von Stresshormonen und Peptiden. Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurde das kolorektale Adenokarzinom als eine hormoninaktive Modelltumorentität verwendet. Es wurden drei Luziferase-exprimierende Varianten von drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien ausgewählt: HCT116-luc, HT29-luc und SW620-luc. Die Untersuchung des die Proliferation stimulierenden Effektes auf die drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien sollte zunächst im Rahmen eines Screenings erfolgen. Das Screening sollte dazu dienen mehrere Substanzen effizient parallel auf das Vorliegen eines Wachstumseffektes auf die Tumorzellen zu testen.

Das Screening erforderte eine geeignete Messmethode zur Detektion der durch Substanzzugabe verstärkten Proliferation der Tumorzellen und der daraus potenziell resultierenden Zellzahlzunahme- oder -abnahme im Vergleich zu der nicht behandelten Negativkontrolle. Die herkömmlichen, in der Literatur bereits beschriebenen Proliferationsassays basierten auf der Erfassung der metabolischen Aktivität der Zellen. Das Prinzip der metabolischen Proliferationsassays besteht darin, dass die Zunahme des metabolischen Umsatzes eines zugegebenen Farbstoffes durch die Zellen mit der Zunahme der Zellzahl korreliert (86). Diese Assays erlauben somit nur eine indirekte Ermittlung der Zellzahl, welche je nach dem metabolischen Aktivitätszustand der Zellen im Moment der Messung variieren kann.

Aus diesem Grund sahen wir die Notwendigkeit der Entwicklung eines Proliferationsassays, welches uns erlauben würde die Zellzahl in einem well direkt zu bestimmen. Wir entschieden uns für die Etablierung eines DAPI-Proliferationsassays. Dieser Assay beinhaltete eine automatisierte Mikroskopzählung der Zellkerne, die mithilfe der DAPI-Kernfärbung vor der Messung sichtbar gemacht wurden. Mithilfe dieser Messmethode konnte die Zellkern- und damit auch die Tumorzellzahl direkt und genau wiedergegeben werden. Zudem ermöglichte diese Methode relativ preiswert und schnell viele Substanzen und deren Auswirkung auf die Proliferation in einem hohen Durchsatz zu testen.

Im ersten Etablierungsschritt sollte eine geeignete Ausgangszellzahl pro well für die Aussaat der Tumorzellen ausgewählt werden. Anhand der **Abbildung 1** erkennt man, dass zwei unterschiedliche Ausgangszellzahlen 5.000 und 10.000 Zellen pro well einer 96-well-Platte, untersucht wurden. In Triplikaten wurden die Zellen mit dem Medium einer der vier

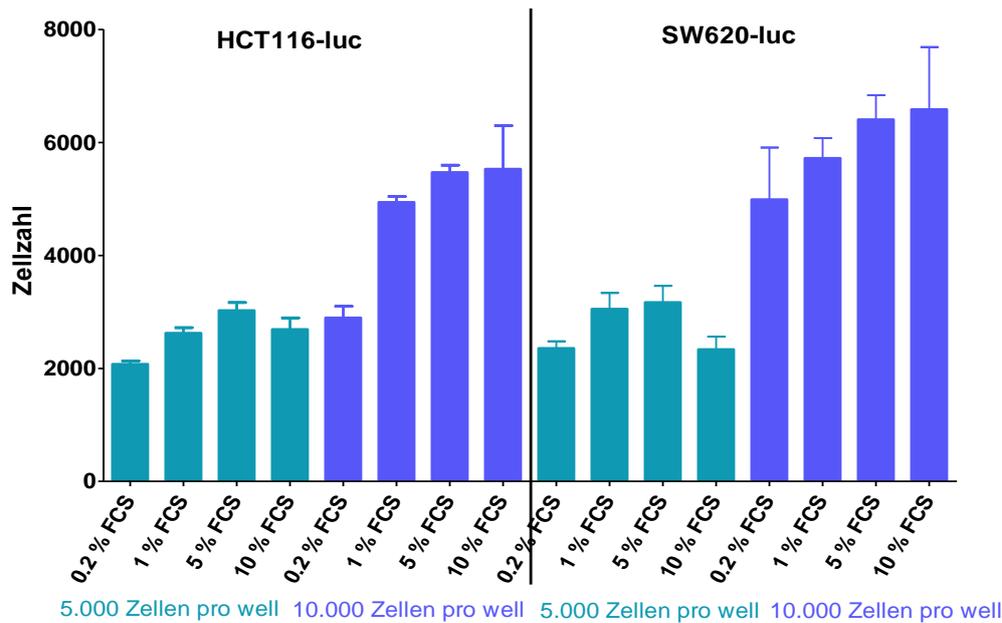


Abb. 1 Ermittlung der optimalen Zellzahl für die Aussaat. Abgebildet wurde die Konzentrationswirkungsbeziehung zwischen der Zellzahl und den ansteigenden FCS-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Ausgangszellzahl bei der Aussaat. Die Balken links repräsentieren die Zellzahlen für die Zelllinie HCT116-luc und die Balken rechts für die SW620-luc. Pro well wurden 5.000 bzw. 10.000 Zellen ausgesät und über 24 h mit Medium verschiedener FCS Konzentrationen in Triplikaten inkubiert. Die Zellzahldetektion erfolgte nach der DAPI-Färbung mithilfe der automatisierten Zellkernzählung. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert, n=1.

ansteigenden FCS-Konzentrationen behandelt und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl nach DAPI-Färbung mit der automatisierten Mikroskopzählung bestimmt. Die Ermittlung der optimalen Zellzahl für die Aussaat wurde für die zwei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien HCT116-luc und SW620-luc vorgenommen. Die Ergebnisse für die Zelllinie SW620-luc befinden sich links in der Abbildung und für die Zelllinie HCT116-luc rechts. Man sieht am Beispiel beider Zelllinien, dass bei der Aussaat von 10.000 Zellen pro well mit steigender FCS-Konzentration die Zellzahl entsprechend der Konzentrationswirkungsbeziehung zunahm. Bei der Aussaat von 5.000 Zellen pro well fiel der Anstieg der Zellzahl nach der Inkubation in Medien ansteigender FCS-Konzentrationen für beide Zelllinien geringer aus und war bei zehnpromzentiger FCS-Konzentration sogar nicht mehr nachweisbar. Die zu erwartende Abhängigkeit zwischen ansteigender FCS-Konzentration und Zellzahl war nach 24 h nur bei der Aussaat von 10.000 pro well detektierbar. Für die folgenden Versuche wurden 10.000 Zellen pro well als Ausgangszellzahl für die Aussaat festgelegt, da unter dieser Bedingung die vom FCS ausgelöste Zellzahlzunahme mit dem automatisierten Mikroskop am deutlichsten detektierbar war.

Anschließend widmeten wir uns der Optimierung des DAPI-Kernfärbeprotokolls. Das Ziel bestand darin den durch unterschiedliche Färbeprotokollschritte bedingten Tumorzellverlust zu

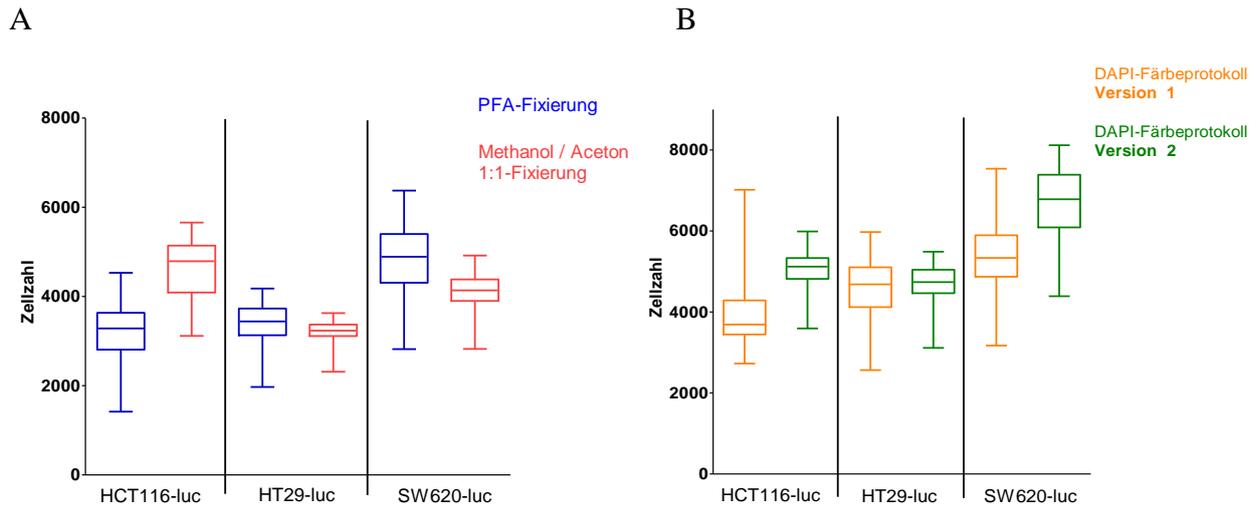
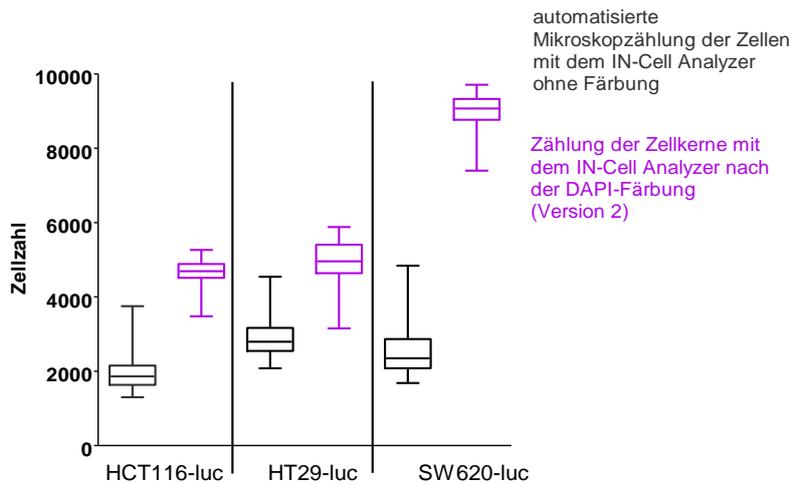


Abb. 2 Ermittlung der optimalen Fixierungsmethode und des optimalen Färbeprotokolls. (A) Es wurden PFA- und Methanol/Aceton-Fixierung gegenübergestellt. Dazu wurden 10.000 Zellen pro well im Medium mit 10 % FCS ausgesät, über 24 h inkubiert und die Zellzahl in der 96-well-Platte nach Fixierung mit PFA- bzw. Methanol/Aceton 1:1-Lösung bestimmt. (B) Vergleich zweier DAPI-Kernfärbeprotokolle für die nachfolgende automatisierte Zellkernzählung. Es wurden dazu 10.000 Zellen pro well im Medium mit Zusatz von 10 % FCS ausgesät, über 24 h inkubiert und die Zellzahl in der 96-well-Platte nach Ausführung der ersten bzw. der zweiten modifizierten und verkürzten DAPI-Färbeprotokollversion gemessen. Die Daten wurden in der Box-Whisker-Plot-Darstellung gezeigt. Der Median teilte die Stichprobe aus verschiedenen Zellzahlwerten in zwei Hälften. 25 % der Zellzahlwerte waren kleiner oder gleich der unteren 25. Percentil und 25 % der Zellzahlwerte waren größer oder gleich der oberen 75. Percentil. Die Whiskers entsprachen der minimalen bzw. maximalen Zellzahl.

vermeiden und die Variationen der Zellzahl zwischen den einzelnen wells innerhalb einer 96-well-Platte gering zu halten. Dazu wurden alle drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien untersucht. Es wurde für jede Tumorzelllinie eine 96-well-Platte mit 10.000 Zellen pro well im 10 % FCS-Medium ausgesät und über 24 h inkubiert. Der **Teil A** der **Abbildung 2** zeigt den Vergleich zwischen zwei Fixierungsmethoden, der PFA- (blau) und der Methanol/Aceton-Fixierung (rot). Bei der Zelllinie HCT116-luc führte die Verwendung der PFA-Fixierung zu einer geringeren mittleren Zellzahl in der 96-well-Platte im Vergleich zur Verwendung der alternativen Methanol/Aceton-Fixierung. Im Gegensatz dazu blieb im Fall der Zelllinie SW620-luc die mittlere Zellzahl nach der PFA-Fixierung höher als nach der Fixierung der Zellen mit Methanol-Aceton, wobei diese wiederum mit einer geringeren Zellzahlvariation zwischen den einzelnen wells einherging. Insgesamt waren keine einheitlichen Ergebnisse bezüglich der mittleren Zellzahl sowie Zellzahlabweichung vom Median innerhalb einer 96-well-Platte in Abhängigkeit von der verwendeten Fixierungsmethode für alle drei Zelllinien zu verzeichnen. Im **Teil B** der **Abbildung 2** wurde ein Vergleich zwischen zwei DAPI-Färbeprotokollversionen angestellt. Bei der zweiten Version (grün) wurde im Gegensatz zu der ersten (orange) die Anzahl der Waschschrte der Zellen reduziert und die Fixierungslösung direkt ins Medium mit 10 % FCS zugegeben. Dabei zeigte sich, dass eine höhere mittlere Zellzahl sowie geringere

Ergebnisse

A



B

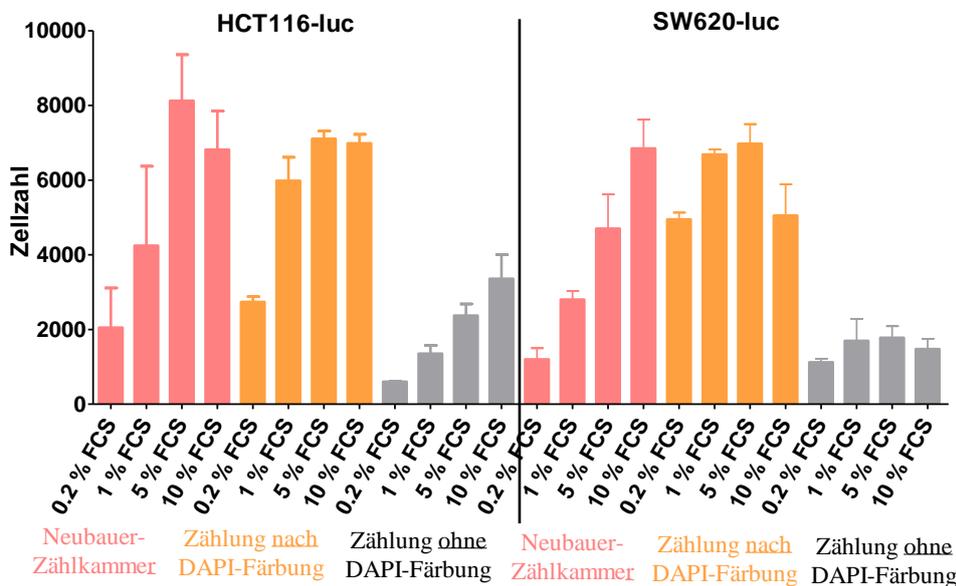


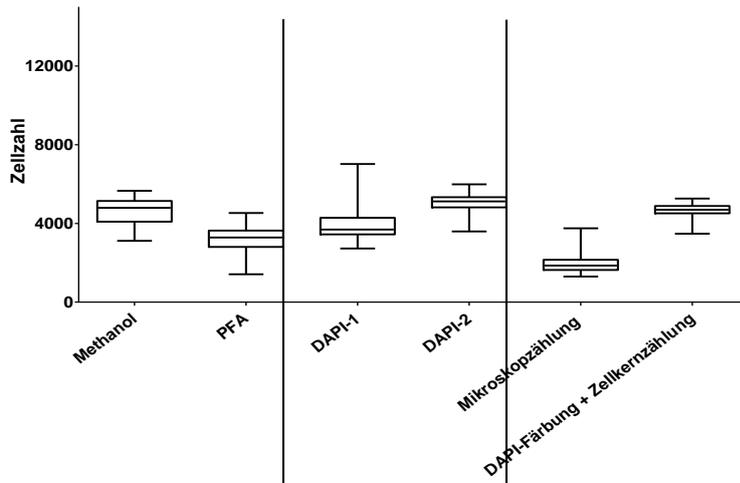
Abb. 3 Etablierung der geeigneten Messmethode zur Zellzahldetektion. (A) Gegenüberstellung zweier Zellzahlmessmethoden. Es wurden dazu 10.000 Zellen pro well im Medium mit Zusatz von 10 % FCS ausgesät und über 24 h inkubiert. Die Zellzahl wurde mithilfe der automatisierten Zellzählung ohne bzw. mit einer DAPI-Zellkernfärbung für drei kolorektale Adenokarzinomzelllinien in jeweils einer 96-well-Platte ermittelt. Die Daten wurden in der Box-Whisker-Plot-Darstellung gezeigt. Der Median teilte die Stichprobe aus verschiedenen Zellzahlwerten in zwei Hälften. 25 % der Zellzahlwerte waren kleiner oder gleich der unteren 25. Perzentil und 25 % der Zellzahlwerte waren größer oder gleich der oberen 75. Perzentil. Die Whiskers entsprachen der minimalen bzw. maximalen Zellzahl. (B) Erfassung der Konzentrationswirkungsbeziehung zwischen der Zellzahl und den ansteigenden FCS-Konzentrationen in Abhängigkeit von der angewandten Zellzahldetektionsmethode. Die linken Balken repräsentierten die Ergebnisse für die Zelllinie HCT116-luc und die rechten Balken für SW620-luc. Es wurden 10.000 Zellen pro well ausgesät und jeweils 3 wells mit dem Medium einer bestimmten FCS-Konzentration behandelt. Die Inkubationszeit betrug 24 h. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit drei verschiedenen Messmethoden, der automatisierten Zellzählung ohne bzw. mit einer vorhergehenden DAPI-Zellkernfärbung bzw. der manuellen Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer als Referenzmethode. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert, n=1.

Zellzahlabweichung vom Zellzahlmedian innerhalb der 96-well-Platte bei der Durchführung des zweiten verkürzten DAPI-Färbeprotokolls im Vergleich zum ersten Protokoll für alle drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien erreicht wurden. Entsprechend den Ergebnissen entschieden uns für die Verwendung der zweiten mit einem geringeren Zellverlust einhergehenden DAPI-Protokollversion zur Zellkernfärbung der Tumorzellen. Vor dem Hintergrund dieser Entscheidung wurde die PFA-Fixierung als eine geeignete Fixierungsmethode gewählt.

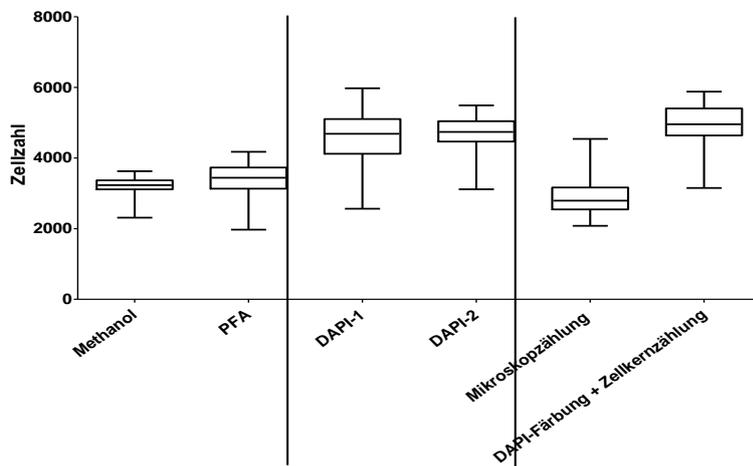
Als Nächstes beschäftigten wir uns mit der Ermittlung der am besten geeigneten Messmethode zur direkten Zellzahlerfassung. Wir hatten die Wahl zwischen der automatisierten Mikroskopzählung mit dem IN-Cell Analyzer, die eine DAPI-Zellkernfärbung erforderte und einer automatisierten Mikroskopzählung der Zellkerne ohne eine vorhergehende DAPI-Färbung. Es wurden ursprünglich wie in den davor aufgeführten Versuchen 10.000 Zellen pro well im 10 % FCS-Medium ausgesät. Die DAPI-Färbung erfolgte nach 24-stündiger Vorinkubation, wobei nach der zweiten (verkürzten) Protokollversion vorgegangen wurde. In **Abbildung 3A** sieht man eine Gegenüberstellung der beiden Zellzahldetektionsmethoden für alle drei Zelllinien. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Messung der Zellzahl mit dem automatisierten Mikroskop nach der davor durchgeführten DAPI-Zellkernfärbung (lila) mit einer höheren mittleren Zellzahl sowie geringeren Zellzahlvariationen innerhalb der 96-well-Platte als die automatisierte Zellzahldetektion ohne DAPI-Färbung (schwarz) einherging. Die **Abbildung 3B** präsentiert die Unterschiede in der Zellzahl in Abhängigkeit von der ansteigenden FCS-Konzentration im Medium. Die Zellen (in Triplikaten) wurden mit einer der vier angegebenen FCS-Konzentrationen inkubiert und nach 24 h wurde die Zellzahl mit einer der drei Messmethoden bestimmt. Die manuelle Zellauszählung unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer stellte die Referenzmethode dar. Bei zwei anderen Messmethoden, welche untereinander sowie mit der Referenzmethode verglichen wurden, handelte es sich wie in Abb. 3A um eine automatisierte Zellkernzählung mit oder ohne DAPI-Kernfärbung. Die Betrachtungen wurden für die beide kolorektalen Adenokarzinomzelllinien, HCT116-luc (links) und SW620-luc (rechts) angestellt. Es stellt sich für beide Tumorzelllinien heraus, dass die Abhängigkeit zwischen der ansteigenden FCS-Konzentration und der wachsenden Zellzahl mithilfe der Zellkernzählung nach einer DAPI-Färbung am besten mit der Referenzmethode zu vergleichen war. Der Verzicht auf die Markierung der Zellkerne hatte zur Folge, dass viele Zellkerne bei der automatisierten Zählung nicht erfasst werden konnten, was sich in geringeren Zellzahlen widerspiegelte. Die zu erwartende Erhöhung der Zellzahl mit steigender FCS-Konzentration fiel bei dieser Messmethode für HCT116-luc gering aus oder war für SW620-luc

Ergebnisse

A



B



C

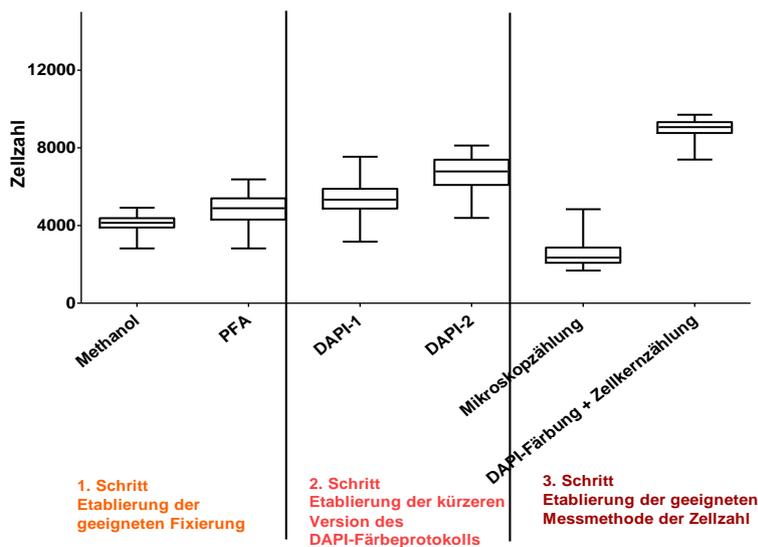


Abb. 4 Chronologischer Ablauf der DAPI-Proliferationsassay-Etablierung für drei kolorektale Adenokarzinomzelllinien, (A) HCT116-luc, (B) HT29-luc und (C) SW620-luc. Es wurde die Veränderung der Zellzahl entsprechend den aufeinander folgenden Etablierungsschritten dargestellt.

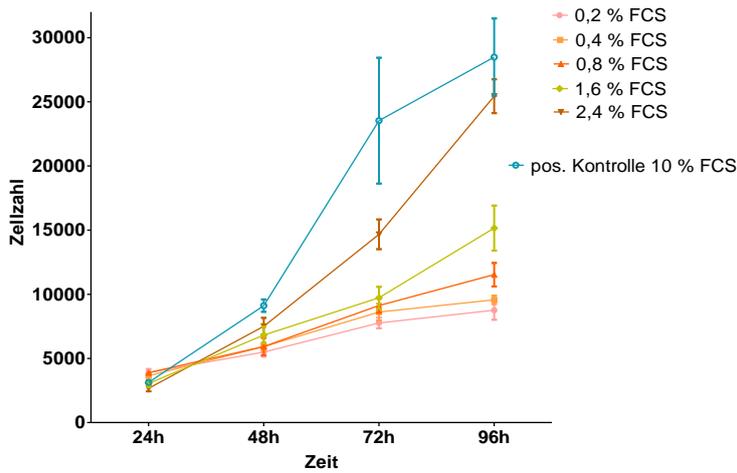
nicht messbar. Die in der Abbildung 3 dargestellten Ergebnisse stützten die Wahl der automatisierten Mikroskopzählung nach DAPI-Färbung entsprechend der zweiten Protokollversion zur Markierung der Kerne von Tumorzellen zum Zweck der genauen direkten Zellzahldetektion.

Abbildung 4 fasst alle drei oben beschriebenen Etablierungsschritte für drei kolorektale Adenokarzinomzelllinien zusammen: Etablierung der optimalen Fixierungsmethode, des optimalen DAPI-Färbeprotokolls und der optimalen Zellzahlmessmethode. Es war bei allen drei Zelllinien der Trend zum Anstieg der mittleren Zellzahl bzw. Abnahme der Zellzahlvariationen über die 96-well-Platte mit jedem neuen Etablierungsschritt erkennbar. Auf der Grundlage der vorgenommenen Etablierungsschritte entstand das endgültige, im Methodenteil beschriebene Protokoll für den DAPI-Proliferationsassay zur direkten quantitativen Erfassung der aus dem Tumorzellwachstum resultierenden Zellzahlveränderungen.

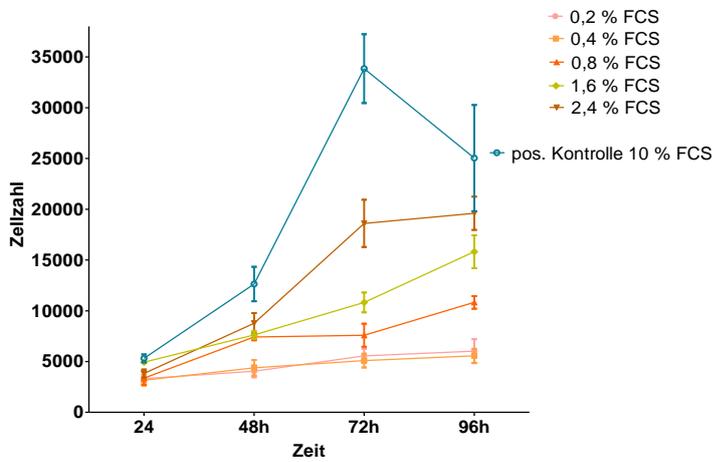
Nach der Etablierung des DAPI-Proliferationsassayprotokolls wurde die Suche nach einer geeigneten Negativ- bzw. Positivkontrolle für unseren Assay begonnen, um den Wachstumseffekt der uns interessierenden Testsubstanzen daran später beurteilen zu können. Zur Generierung der Negativ- und Positivkontrolle setzten wir fötales Kälberserum ein, das bekanntermaßen Zellwachstum stimuliert. Für jede der drei kolorektalen Tumorzelllinien wurde ein separater FCS-Titrationsversuch geplant. Dafür wurden insgesamt sechs ansteigende FCS-Konzentrationen festgelegt: 0,2 %, 0,4 %, 0,8 %, 1,6 %, 2,4 % und 10 % FCS. Es erfolgte eine Aussaat von 10.000 Zellen pro 96-well-Platte. Sechs well dieser Platte wurden im Anschluss darauf mit dem Medium einer der sechs oben aufgezählten FCS-Konzentrationen behandelt. Der FCS-Titrationsversuch dauerte vier Tage, wobei der Mediumwechsel alle 24 h stattfand. Die **Abbildung 5** stellt die Ergebnisse des Titrationsversuches für alle drei kolorektale Adenokarzinomzelllinien (A-C) dar. Für jede der sechs FCS-Konzentrationen ergab sich eine Kurve, die den Verlauf der Zellzahlzunahme über die Zeit wiedergab. Für alle drei Zelllinien konnte man festhalten, dass je höher die FCS-Konzentration im Medium war, desto steileren Anstieg nahm die entsprechende Kurve. Die Zellzahlunterschiede wurden erst ab 72 Stunden aussagekräftig und groß genug, um diese sicher detektieren zu können. Allerdings war bei der Zelllinie HT29-luc ein Rückgang der Zellzahl bei den höchsten FCS-Konzentrationen (10 % und 2,4 % FCS) nach 96 Stunden zu vermerken. Denn die nach 72 Stunden zu beobachtende rasante Zellzahlzunahme führte zu einem Überschuss der Zellen mit dem daraus resultierenden Platz- und Nährstoffmangel sowie der Ansammlung von toxischen Abbauprodukten, die für das Kippen des Gleichgewichtes zwischen Zellvermehrung und Zelltod in Richtung des vermehrten Zellunterganges ursächlich sein könnten. Die dokumentierte HT29-luc-Zellzahlverringering

Ergebnisse

A



B



C

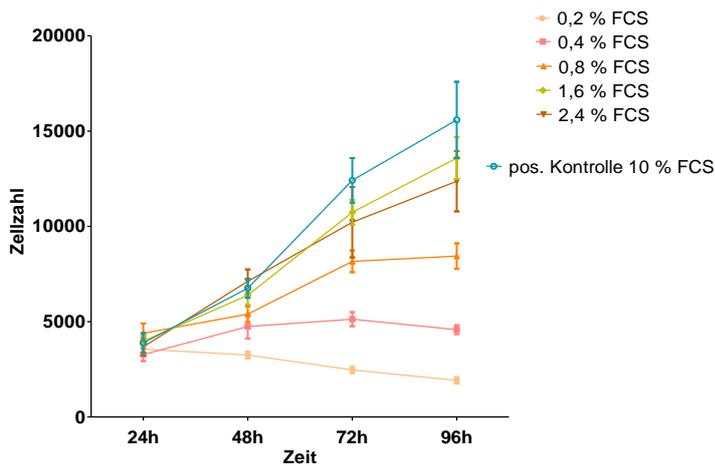


Abb. 5 Titrationsversuch zur Ermittlung der geeigneten FCS-Konzentration für die Negativ- und Positivkontrolle. Für jeden der vier Inkubationszeitpunkte wurde eine 96-well-Platte mit 10.000 Zellen pro well angesetzt. Es wurden Medien mit 6 verschiedenen FCS-Konzentrationen hergestellt und jeweils 6 wells einer Platte mit dem Medium einer der aufgeführten FCS-Konzentrationen behandelt, der Mediumwechsel erfolgte alle 24 h. Die Ergebnisse wurden für drei kolorektale Adenokarzinomzelllinien, (A) HCT116-luc, (B) HT29-luc und (C) SW620-luc als Mittelwert \pm SD der Zellzahl zu unterschiedlichen Inkubationszeiten für 6 getestete FCS-Konzentrationen dargestellt, $n=1$.

könnte auch artifiziell durch die starke Überkonfluenz der Zellen nach 96 Stunden entstanden sein, die das Gerät IN-Cell-Analyzer an der genauen Erfassung der Zellkernzahl aufgrund der Überlappung der Zellkerne hinderte. Es handelte sich bei allen drei Tumorzelllinien um durch FCS ausgelöste Wachstumseffekte, die sich allerdings spät manifestierten. Diese Beobachtung bewegte uns zu der Entscheidung für eine Versuchsdauer von insgesamt 96 Stunden für unseren DAPI-Proliferationsassay, um die Erfassung der Späteeffekte auf die Proliferation zu ermöglichen. Außerdem war für alle drei Tumorzelllinien ersichtlich, dass der höchste Kurvenanstieg sowie die maximale Zellzahl bei der FCS-Konzentration von 10 % lagen. 10 % FCS brachte den höchsten Zellzahlzuwachs und eignete sich am besten für die Positivkontrolle. Bei der Wahl der optimalen Negativkontrolle orientierte man sich danach, dass der Kurvenanstieg zwar klein war, das Zellwachstum und somit eine Zellzahlzunahme über die Zeit aber noch möglich blieben. Zwischen den Kurvenverläufen bzw. den nach 96 Stunden erzielten Zellzahlen für die Positiv- und Negativkontrolle sollte ein möglichst großer Unterschied erkennbar sein, denn die Wachstumskurve für die später zu untersuchenden Substanzen sollte sich nach unserer Erwartung genau in dieser entstandenen „Lücke“ zwischen der Negativ- und Positivkontrolle positionieren. Da jedoch die Kurvenverläufe bzw. -anstiege für die einzelnen FCS-Konzentrationen sowie die Zellwachstumsdynamik zwischen den drei Zelllinien variierten, musste für jede Zelllinie eine individuelle Negativkontrolle bestimmt werden. Den oben erwähnten Kriterien für die Negativkontrolle folgend wurde 1,6 % FCS-Konzentration als Negativkontrolle für HCT116-luc, 0,8 % FCS-Konzentration für HT29-luc und 0,6 % FCS-Konzentration für SW620-luc gewählt.

Im letzten Schritt der Etablierung unseres DAPI-Proliferationsassays sollte überprüft werden, ob eine Proliferationswirkung durch eine alternative, definierte, das Tumorzellwachstum bekanntermaßen fördernde Substanz mithilfe dieses Assays nachgewiesen werden kann. Wir nahmen den IGF-1, von dem wir wussten, dass er als ein gut charakterisierter Wachstumsfaktor die Tumorzellproliferation anregt. Unsere Positivkontrolle, die aus dem Medium mit 10 % FCS bestand, enthielt eine Reihe von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren. Uns interessierte allerdings, ob ein einzelner Wachstumsfaktor wie IGF-1 einen vergleichbaren Proliferationseffekt wie die von uns benutzte Positivkontrolle im DAPI-Proliferationsassay liefern würde. Die **Abbildung 6** zeigt die Proliferationswirkung von IGF-1 auf die Tumorzellen der Zelllinie SW620-luc. Die Ergebnisse wurden als Zellzahl in Prozent vom Mittelwert der Positivkontrollzellzahl, welcher als 100 % angenommen wurde, dargestellt. Von der Graphik war eine Konzentrationswirkungsbeziehung zwischen der ansteigenden IGF-1-Konzentration und der Zunahme der Zellzahl im Vergleich zu der Negativkontrolle ablesbar. Die Zugabe der

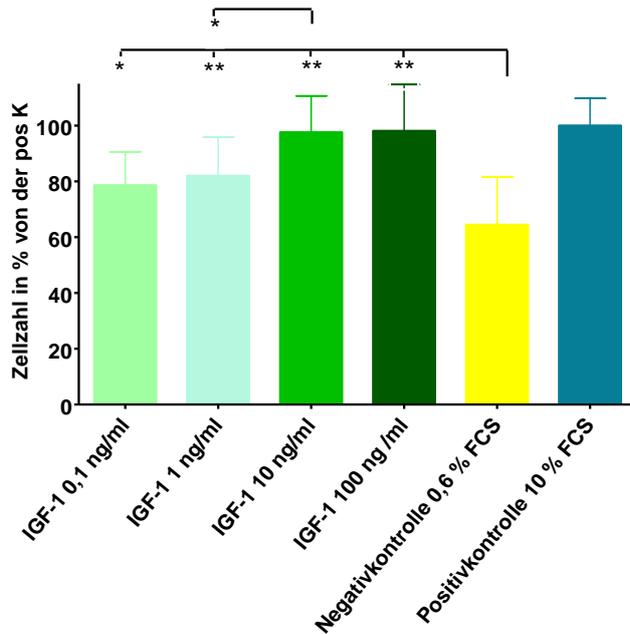


Abb. 6 Nachweis des dosisabhängigen Wachstumseffektes von IGF-1 im DAPI-Proliferationsassay. 10.000 Zellen pro well wurden ausgesät und über 96 h inkubiert. Das Medium mit 0,6 % FCS diente als Negativ- und das Medium mit 10 % FCS als Positivkontrolle. IGF-1 wurde in vier Konzentrationen im Medium mit 0,6 % FCS gelöst. Der Mediumwechsel erfolgte alle 24h. Die Ergebnisse wurden repräsentativ für die Zelllinie SW620-luc und als Zellzahl in Prozent von der Positivkontrolle, welche als 100 % angesetzt wurde, dargestellt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert. Die Auswertung erfolgte mit one-way ANOVA, gefolgt vom Newman-Keuls-Post-Test, $p < 0,05$, $n = 3$. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

maximalen IGF-1-Konzentration von 100 ng/ml erzielte einen mittleren Zellzahlzuwachs von 90 % von der Positivkontrolle. Die Gabe von IGF-1 allein führte also zu einem mit der mit 10 % FCS beladenen Positivkontrolle vergleichbar hohen Zellzahlanstieg.

An diesem Punkt wurde die Etablierung des DAPI-Proliferationsassays beendet. In der Zusammenfassung wurde ein einheitliches Assayprotokoll verfasst, eine geeignete Positiv- und Negativkontrolle für die drei als unser Tumorzellmodell dienenden kolorektalen Adenokarzinomzelllinien ermittelt und ein durch den klassischen Wachstumsfaktor, IGF-1, ausgelöster Proliferations-effekt mithilfe des DAPI-Proliferationsassays nachgewiesen. Im nächsten Schritt wurde zur Untersuchung von unterschiedlichen Substanzen im Rahmen eines Screeningverfahrens mit dem DAPI-Proliferationsassays auf das Vorhandensein eines detektierbaren Wachstumseffektes übergegangen.

4.2 Screening zur Untersuchung des Proliferations-effektes von Stresshormonen und Peptiden

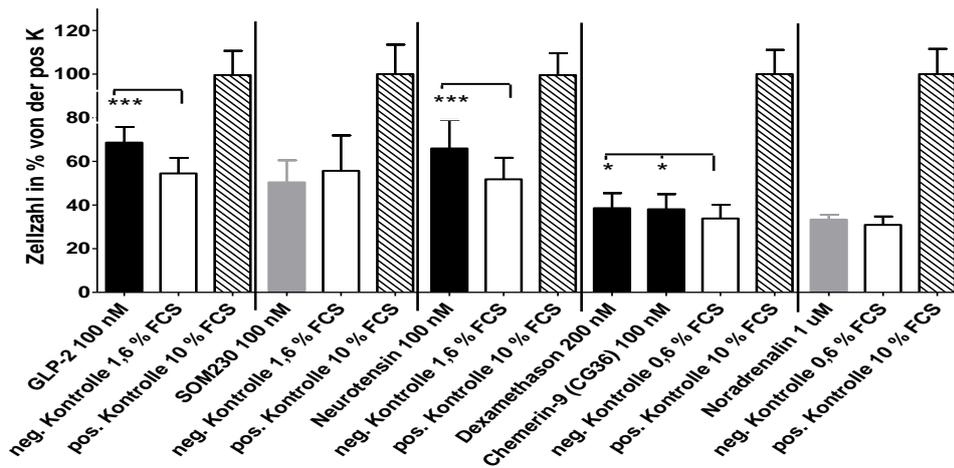
Dieser Abschnitt befasst sich mit den Ergebnissen des durchgeführten Screenings. Das Screening erfüllte den Zweck den Tumorzellwachstum-stimulierenden Effekt von unterschiedlichen

Substanzen auf drei kolorektale Adenokarzinomzelllinien zu untersuchen. Zu den zu untersuchenden Substanzen gehörten die beiden Stresshormone Dexamethason und Noradrenalin sowie die Peptide Neurotensin (stabile Variante Lys8Lys9-Neurotensin 8-13), Glukagon-like peptide 2 (stabile Variante Gly2-GLP-2), SOM230 (ein stabilisiertes Somatostatinanalogon) und Chemerin-9 (stabile Variante, CG36). Zur Detektion der Wirkung der aufgezählten Substanzen auf das Verhalten der Tumorzellen wurden zwei unterschiedliche von einander unabhängige Methoden verwendet, der im vorherigen Abschnitt von uns etablierte DAPI-Proliferationsassay und der bereits von zahlreichen Forschungsgruppen angewendete Human Tumor Colony Forming Assay (HTCA).

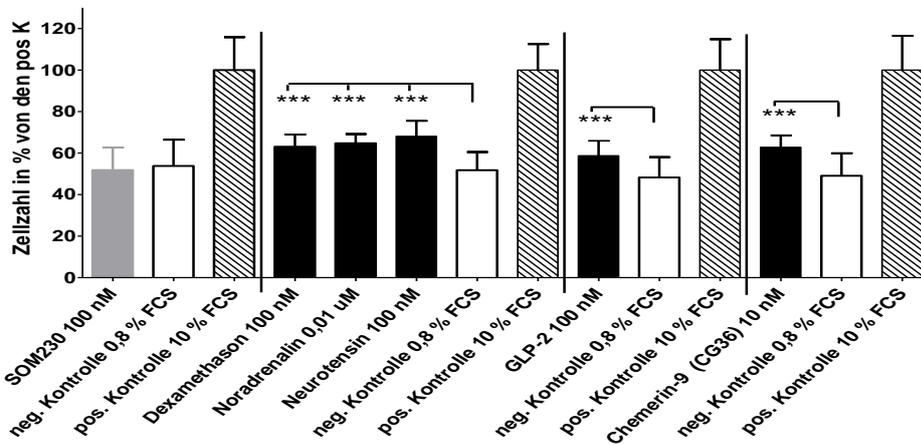
Der DAPI-Proliferationsassay hatte die Aufgabe die durch die Behandlung mit den getesteten Substanzen herbeigeführte Zellzahländerung im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle nach 96 Stunden quantitativ zu erfassen. Dazu wurden die Zellen einer der drei kolorektalen Zelllinien auf einer 96-well-Platte gleichmäßig ausgesät und jeweils in 6-facher Ausfertigung mit einer Konzentration einer der getesteten Substanzen behandelt. Für die Negativ- bzw. Positivkontrolle wurden dagegen 12 wells verwendet, wobei die Positivkontrolle aus Medium mit 10 % FCS und die Negativkontrolle aus Medium mit 1,6 %, 0,8 % oder 0,6 % FCS, je nach verwendeter Zelllinie, bestanden. In der **Abbildung 7** findet man eine Zusammenfassung der Screeningergebnisse für alle drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien. Die Proliferationswirkung jeder einzelnen der sechs untersuchten Substanzen war als Zellzahl in Prozent vom Mittelwert der Positivkontrollzellzahl, welcher mit 100 % gleichgesetzt und mit einem schraffierten Balken bezeichnet wurde, abgebildet. Es wurden oft mehrere Substanzen parallel in einem Versuch auf ihre Proliferationswirkung hin untersucht und besaßen deswegen eine gemeinsame Negativkontrolle, die immer mit einem weißen Balken symbolisiert wurde. Die Ergebnisse für die Substanzen, die einen signifikanten Unterschied in der Zellzahl in Bezug auf die Negativkontrolle bewirkten, wurden als schwarze Balken dargestellt. Die grauen Balken standen für die Substanzen, die keine statistisch signifikante Wirkung auf die Tumorzellproliferation ausübten. Es wiesen lediglich zwei Substanzen, Dexamethason und Chemerin-9, für alle drei Tumorzelllinien einen signifikanten Wachstumseffekt im Vergleich zur Negativkontrolle auf. Für die Substanzen wie GLP-2, Neurotensin und Noradrenalin waren in nur zwei von drei Zelllinien signifikante positive Einflüsse auf die Tumorzellproliferation zu verzeichnen.

Neben dem DAPI-Proliferationsassay machten wir uns eine weitere Methode zur Nutze, um das Verhalten der kolorektalen Adenokarzinomzellen bezüglich der Tumorzellwachstumssteigerung

HCT116-luc



HT29-luc



SW620-luc

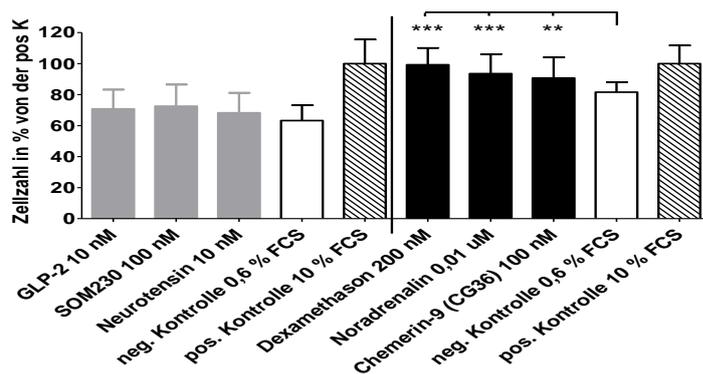
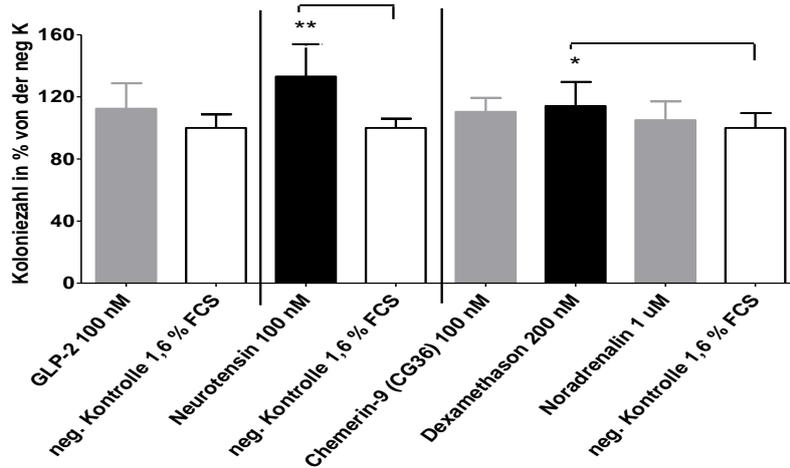
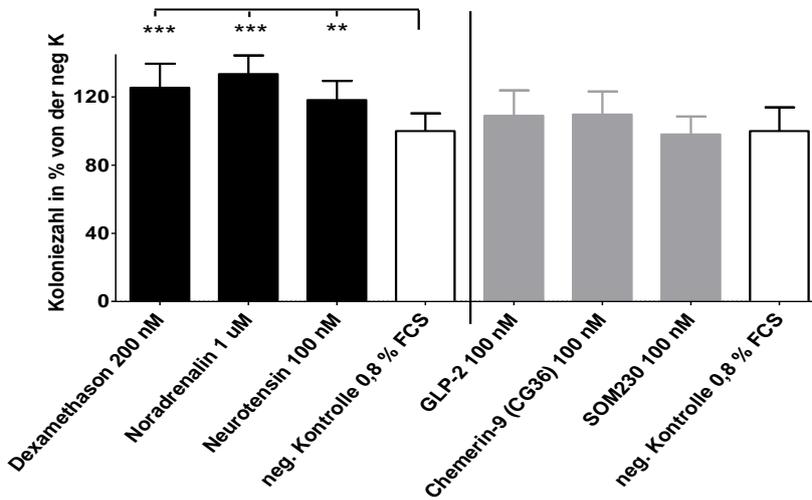


Abb. 7 Ergebniszusammenfassung des Screenings der Stresshormone und Peptide auf den Proliferation stimulierenden Effekt mit DAPI-Proliferationsassay. 10.000 Zellen pro well wurden ausgesät (6 wells pro Substanz und 12 wells für die Negativ- bzw. Positivkontrolle). Die Negativ- und Positivkontrolle bestanden aus der äquivalenten Behandlung mit Medium einer für die Zelllinie festgelegten FCS-Konzentration. Die Inkubationszeit betrug 96 h, der Mediumwechsel mit einer erneuten Substanzzugabe erfolgte alle 24 h. Es wurden die Ergebnisse für drei kolorektale Adenokarzinomzelllinien, HCT116-luc, HT29-luc und SW620-luc, als Zellzahl in Prozent von der Positivkontrolle, welche als 100 % angesetzt wurde, abgebildet. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert. Die Auswertung erfolgte mit one way ANOVA mit dem Newman-Keuls-Post-Test bzw. mit dem Student's t-Test, $p < 0,05$, $n=3$. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

HCT116-luc



HT29-luc



SW620-luc

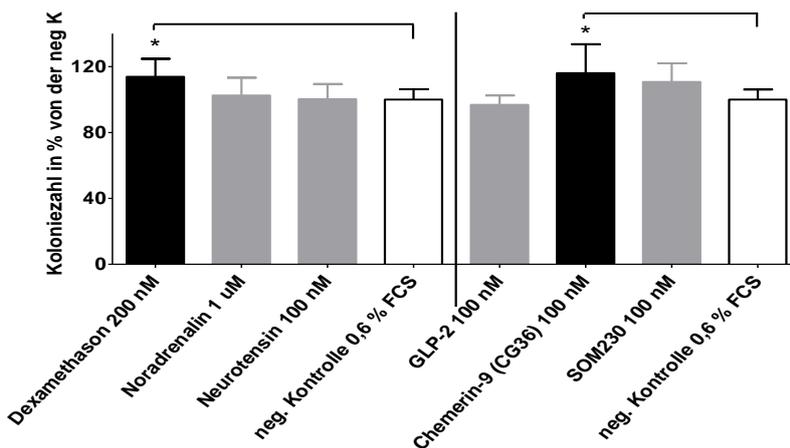


Abb. 8 Ergebniszusammenfassung des Screenings der Stresshormone und Peptide auf den Koloniebildung stimulierenden Effekt mittels HTCA. Die Zellen wurden 7 Tage auf den HTCA-Schalen inkubiert und täglich mit der zu untersuchenden Substanz behandelt. Die Negativkontrolle bestand aus der äquivalenten Behandlung mit dem Medium einer für die Zelllinie festgelegten FCS-Konzentration. Es wurden die Ergebnisse für drei kolorektale Adenokarzinomzelllinien, HCT116-luc, HT29-luc und SW620-luc, als Koloniezahl in Prozent von der Negativkontrolle, welche als 100 % angesetzt wurde, abgebildet. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert. Die Auswertung erfolgte mit one way ANOVA mit dem Newman-Keuls-Post-Test bzw. mit dem Student's t-Test, $p < 0,05$, $n=3$. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

Ergebnisse

Substanz	Zelllinien					
	HCT116-luc		SW620-luc		HT29-luc	
	<u>DAPI-Proliferations assay</u>	<u>HTCA</u>	<u>DAPI-Proliferations assay</u>	<u>HTCA</u>	<u>DAPI-Proliferation assay</u>	<u>HTCA</u>
Neurotensin	++	+	-	-	++	+
GLP-2	++	-	-	-	++	-
Chemerin-9 (CG36)	+	-	+	+	++	-
Dexamethason	+	+	++	+	++	++
Noradrenalin	-	-	++	-	++	++
SOM230	-	n.d.	-	-	-	-

Tab. 1 Ergebniszusammenfassung des Screenings zur Untersuchung der Proliferation und Koloniebildung *in vitro* stimulierenden Wirkung von Stresshormonen und Peptiden auf das kolorektale Adenokarzinom. Die Daten wurden für drei kolorektale Adenokarzinomzelllinien, HCT116-luc, SW620-luc und HT29-luc, mit Hilfe der zwei unterschiedlichen Detektionsmethoden des DAPI-Proliferationsassays und HTCA erhoben. Zur Auswertung wurden die one way ANOVA mit dem Newman-Keuls-Post-Test bzw. der Student's t-Test benutzt, $p < 0,05$, $n=3$.
 - kein Effekt ; + signifikanter Proliferationseffekt mit den Signifikanzstufen * , ** ; ++ signifikanter Proliferationseffekt mit den Signifikanzstufen *** , **** ; n.d. – not done.

nach der Behandlung mit zwei Stresshormonen und vier Peptiden zu beschreiben. Als eine alternative Methode im Rahmen des Screenings wurde der HTCA (Human Tumor Colony Forming Assay) durchgeführt, welcher uns ermöglichte die Koloniebildung der behandelten Tumorzellen im Vergleich zu der nicht behandelten Negativkontrolle zu messen. Dazu wurden die Zellen auf dem HTCA-Agar ausgesät, wobei pro Substanz bzw. Negativkontrolle drei HTCA-Schalen angesetzt wurden. Die Substanzen wurden in für die Negativkontrolle vorbereiteten Medium gelöst und einmal täglich auf den Agar gegeben. Zur Generierung der Negativkontrolle wurde die bereits beim DAPI-Proliferationsassay ermittelte FCS-Konzentration benutzt. Auf eine Positivkontrolle wurde verzichtet. Die **Abbildung 8** repräsentiert die Ergebnisse des HTCA für drei getestete kolorektale Adenokarzinomzelllinien. In einem Versuch parallel untersuchte Substanzen verfügten über eine gemeinsame als ein weißer Balken dargestellte Negativkontrolle. Der Effekt der Stresshormone und Peptide auf die Koloniebildung wurde in der Koloniezahl in Prozent vom Mittelwert der Koloniezahl der Negativkontrolle (=100 %) ausgedrückt. Brachte eine der Substanzen einen statistisch signifikanten positiven Effekt hervor, wurde dieser mit einem schwarzen Balken im Gegensatz zu dem grauen Balken dargestellt, welcher das Fehlen einer positiven Wirkung auf die Koloniebildung im Vergleich zur

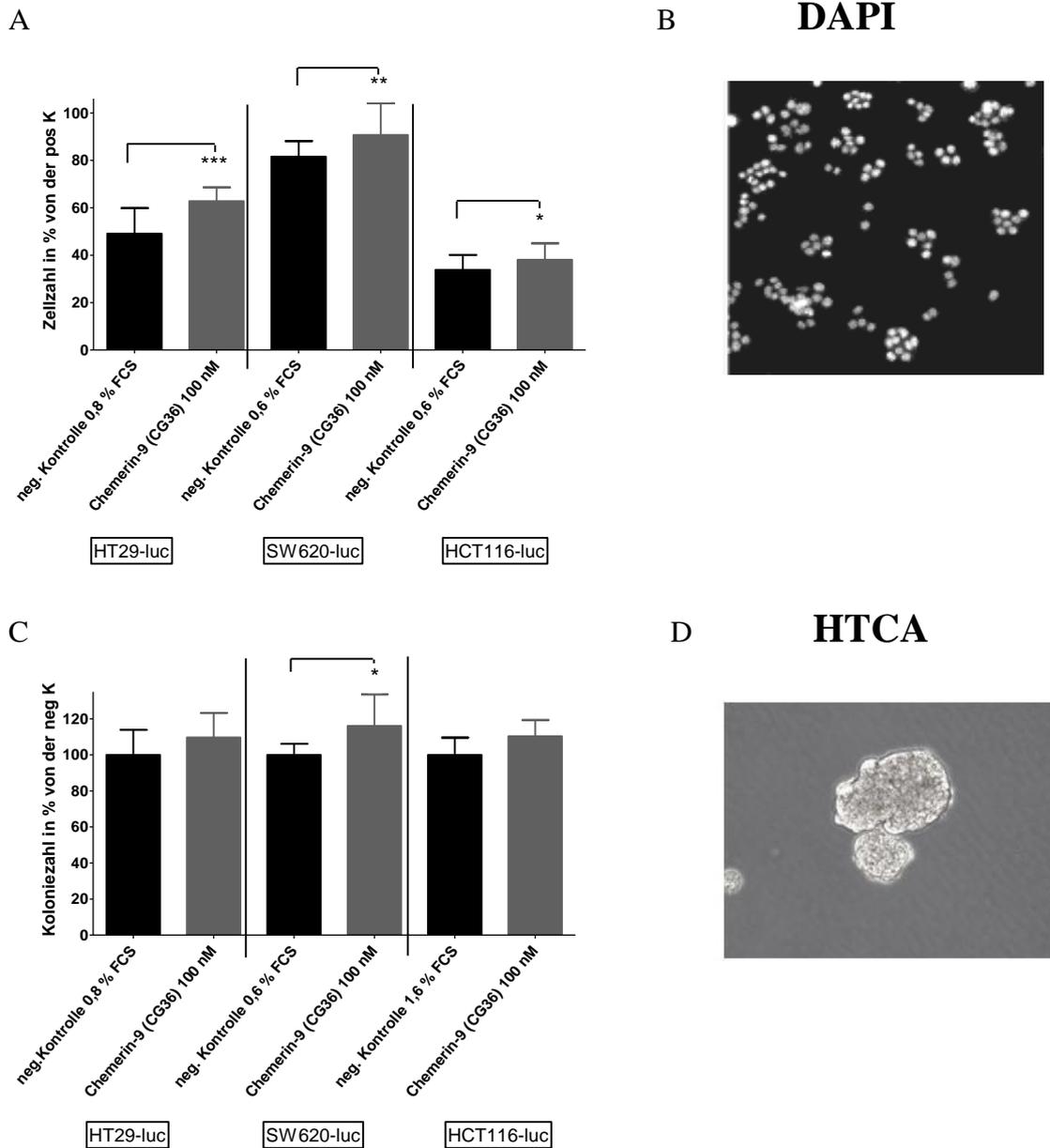


Abb. 9 Darstellung der Effekte der stabilen Chemerin-9-Variante CG36 auf die kolorektalen Adenokarzinomzelllinien. (A) DAPI-Proliferationsassay-Ergebnisse zur Detektion des Proliferationseffektes von CG36 auf HT29-luc, SW620-luc und HCT116-luc. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Einzelversuchen und wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert. (B) Darstellung der Nuclei einer kolorektalen Adenokarzinomzelllinie nach der DAPI-Färbung. (C) HTCA-Ergebnisse zur Detektion des Koloniebildung stimulierenden Effektes von CG36 auf HT29-luc, SW620-luc und HCT116-luc. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Einzelversuchen und wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert. (D) Darstellung einer kolorektalen Adenokarzinomzellkolonie aus dem Human Tumor Colony Forming Assay (HTCA).

Negativkontrolle symbolisierte. Nur Dexamethason zeichnete sich durch einen die Koloniebildung stimulierenden Effekt bei allen drei kolorektalen Tumorzelllinien aus. Neutrotenin, Noradrenalin und Chemerin-9 verstärkten die Koloniebildung der Tumorzellen im Falle von einer oder maximal zwei kolorektalen Zelllinien.

Um die Ergebnisse aus dem DAPI-Proliferationsassay und HTCA zusammenzuführen und eine

Übersicht über die Screeningresultate zu verschaffen, wurde die **Tabelle 1** erstellt. Sie fasste die Ergebnisse für die sechs untersuchten Substanzen für die drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien zusammen und stellte gleichzeitig die beiden zum Screening angewandten Methoden zur Untersuchung des proliferativen Tumorzellverhaltens gegenüber. Die Stärke des positiven Proliferations- bzw. Koloniebildungseffektes wurde anhand des Signifikanzgrades dieses positiven Effektes berücksichtigt. Die Ergebniszusammenfassung für das Peptid Chemerin-9 wurde grau unterlegt. Mithilfe beider Assays konnte der Einfluss von Chemerin-9 auf die Proliferation und Kolonienbildung von kolorektalen Adenokarzinomzellen aufgeklärt werden.

In der **Abbildung 9** sind die Daten speziell für Chemerin-9 aus den bereits gezeigten DAPI- und HTCA-Assays zusammengeführt. Der **Teil A** lieferte eine Übersicht über die DAPI-Proliferationsassay-Ergebnisse für die stabile Chemerin-9-Variante CG36. Man sah, dass CG36 eine stimulierende und statistisch signifikante Proliferationswirkung bei allen drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien hatte. Der für die Abbildung der HTCA-Daten für Chemerin-9 zuständige **Teil C** schilderte, dass CG36 lediglich bei der Tumorzelllinie SW620-luc einen die Koloniebildung verstärkenden Effekt induzierte. Bei den zwei anderen kolorektalen Tumorzelllinien war die Behandlung mit dem stabilen Chemerin-9 für eine ebenfalls stimulierende, jedoch im Vergleich zur Negativkontrolle nicht statistisch signifikante Wirkung auf die Koloniebildung verantwortlich.

Die aus dem DAPI-Proliferationsassay sowie HTCA gewonnenen Ergebnisse in Bezug auf Chemerin-9 rückten in den Fokus unserer Aufmerksamkeit, denn die Rolle dieses Peptids für das Tumorstadium *in vitro* sowie sein Einfluss auf solche weiteren Tumoreigenschaften wie z. B. Koloniebildung sind anhand der Literaturlage noch nicht ausreichend geklärt. Anhand der bisher von uns zusammengetragenen Daten ergaben sich weiterführende Fragestellungen zu den Mechanismen, die sich hinter den detektierten Effekten von Chemerin-9 auf das Tumorstadium verbergen, und wir entschlossen uns zu ihrer Bearbeitung.

4.3 In-vitro-Internalisierung von Chemerin-9

Aus dem Nachweis einer proliferations- und koloniebildungsfördernden Wirkung von Chemerin-9 in den drei kolorektalen Tumorzelllinien entstand die Frage, ob die damit notwendig verbundene Rezeptor- und zelluläre Aktivierung zusätzlich in einer anderen Methode demonstriert werden kann. Da GPCRs wie die zwei Chemerinrezeptoren (CMKLR1, GPR1) charakteristischerweise nach Agonistenbindung gemeinsam mit dem Liganden internalisieren (69, 72), sollte ein solcher

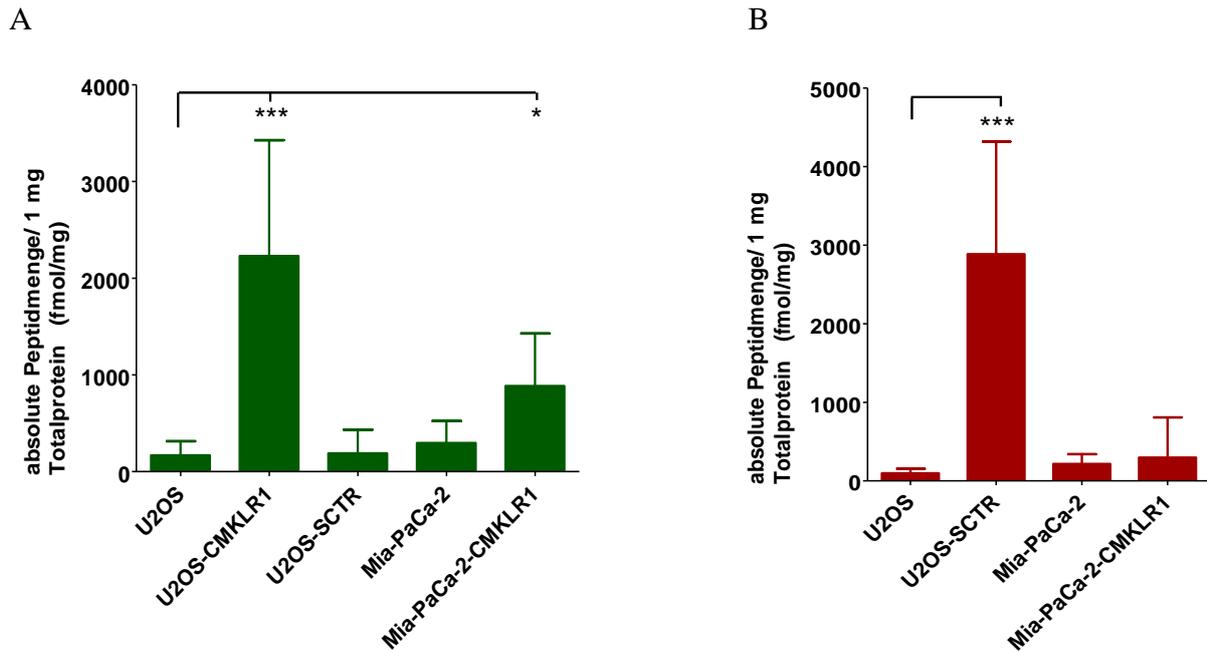


Abb. 10 Etablierung der Negativ- und Positivkontrolle für den Internalisierungsassay. (A) Untersuchung der CG37-Internalisierung in die Wildtypen bzw. mit dem Chemerin-9-Rezeptor CMKLR1 und dem Sekretinrezeptor SCTR transfizierten U2OS- und Mia-PaCa-2-Zelllinien. CG37 ist eine mit dem ITCC-Farbstoff gekoppelte Chemerin-9-Variante. (B) Untersuchung der Sekretin-Internalisierung in die Wildtypen und mit dem Chemerin-9-Rezeptor, CMKLR1 und dem Sekretinrezeptor SCTR transfizierten Varianten der U2OS- und Mia-PaCa-2-Zelllinien. Sekretin ist mit dem IDCC-Farbstoff gekoppelt. Die getesteten Zellen wurden mit CG37 (c=100 nM) bzw. Sekretin (c=100 nm) 10 min inkubiert, danach lysiert und auf ein SDS PAGE-Elektrophoreseigel aufgetragen. Die Fluoreszenzsignal detektion erfolgte mithilfe des Odyssey-Scanners bei 800 bzw. 700 nm. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert. Für die Auswertung wurde die one way ANOVA mit dem Newman-Keuls-Post-Test verwendet, $p < 0,05$, $n \geq 3$. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$

aktivierungsassoziierter Effekt über die spezifische Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Chemerin messbar sein. Zu diesem Zweck wurde ein Internalisierungsassay auf der Basis einer mit dem Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff Indotricarbocyanin (ITCC) markierten stabilen Chemerin-9-Variante entwickelt. Mithilfe des Internalisierungsassays sollte uns gelingen, die Bindung und nachfolgende Internalisierung von Chemerin-9 in die Tumorzellen zu verfolgen. Die Aufnahme des als ein Ligand fungierenden Chemerin-9 in die Zellen könnte dabei in Verbindung mit einer möglichen Weiterleitung des durch Chemerin-9 vermittelten Signals zur Tumorpheriferation stehen.

Unser Internalisierungsassay bedurfte zunächst der Etablierung einer optimalen Positiv- und Negativkontrolle, die die **Abbildung 10** beschreibt. Es wurden die Wildtypen sowie die mit Chemerinrezeptor CMKLR1 bzw. Sekretinrezeptor SCTR transfizierten Varianten der zwei Zelllinien Mia-PaCa-2 und U2OS verwendet. Mia-PaCa-2 war eine humane Pankreaskarzinomzelllinie und die U2OS eine humane Osteosarkomzelllinie. In beiden

Zelllinien wurde keine endogene Expression von Chemerinrezeptoren vermutet. Sekretin war ebenfalls ein Peptid wie Chemerin-9. Zur Durchführung des Assays wurden die Wildtyp- sowie die mit dem entsprechenden Rezeptor transfizierten Zellen in serumfreiem Medium, worin zwei Peptide gemeinsam gelöst wurden, über 10 min inkubiert. Dabei handelte es sich um die an den Fluoreszenzfarbstoff ITCC gekoppelte stabile Chemerin-9-Variante CG37 und den an einen anderen Farbstoff (IDCC) gekoppelten SCTR-Liganden Sekretin. ITCC und IDCC waren parallel und unabhängig voneinander nachweisbar, da sich ihre Anregungs- und Emissionsmaxima hinreichend unterschieden. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen lysiert und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen, das nach 2 Stunden Gelelektrophoresezeit mit dem Odyssey-Scanner auf das Vorliegen eines Fluoreszenzsignals gescannt wurde. Zur Auswertung wurde für das durch den Odyssey-Scanner detektierte Signal eine absolute Peptidkonzentration anhand einer zuvor auf das Gel mit aufgetragenen und gescannten Standardreihe des CG37 errechnet. Die Peptidkonzentration wurde wiederum auf ein 1 mg des aus der Tumorzelllyse gewonnenen Proteins (BCA-Assay) normalisiert. Die **Abbildung 10A** zeigt die detektierte Menge internalisierter Peptide nach der Vorbehandlung der untersuchten Zellen mit der Chemerin-9-Variante CG37. Es fiel auf, dass die beiden mit dem Chemerinrezeptor transfizierten Zelllinien Mia-PaCa-2-CMKLR1 und U2OS-CMKLR1 eine signifikant höhere Peptidmenge pro Totalprotein im Vergleich zu den Wildtypen aufwiesen. Die Wildtypen, die keinen Chemerinrezeptor überexprimierten, nahmen fast kein farbstoffgekoppeltes Chemerin-9-Analogon in ihr Zellinneres auf und sanden deswegen kaum Fluoreszenzsignale aus. Eine hohe Internalisierung konnte somit hier nur bei Überexpression von Chemerinrezeptoren auf der Zelloberfläche mit der nachfolgenden Internalisierung des farbstoffgekoppelten Chemerin-9 erzielt werden. Die CMKLR1-transfizierten U2OS, in geringerem Maße auch Mia-PaCa-2-CMKLR1, stellten daher eine gute Positivkontrolle dar. Die unspezifische, mutmaßlich nicht durch CMKLR1 vermittelte Farbstoffaufnahme in die Wildtypzellen lag bei fast Null, sodass die Wildtypen der Mia-PaCa-2- und U2OS-Zelllinie als geeignete Negativkontrollen gelten konnten. Auch bei der SCTR-transfizierten U2OS-Zelllinie wurde ein sehr kleiner Wert im Vergleich zu U2OS-CMKLR1 beobachtet. CG37 schien nur an den Chemerinrezeptor CMKLR1 spezifisch zu binden und darüber die Aufnahme in das Zellinnere zu bewirken. Ein alternativer Peptidrezeptor wie SCTR bot der Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Chemerin-9-Variante keine Bindungs- bzw. Internalisierungsmöglichkeit. Im **Teil B** sind die Signale nach der Sekretinbehandlung abgebildet. Nur die mit dem Sekretinrezeptor transfizierten U2OS-Zellen nahmen viel vom an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekretin auf und zeichneten sich deswegen durch eine signifikant höhere Peptidmenge als die übrigen

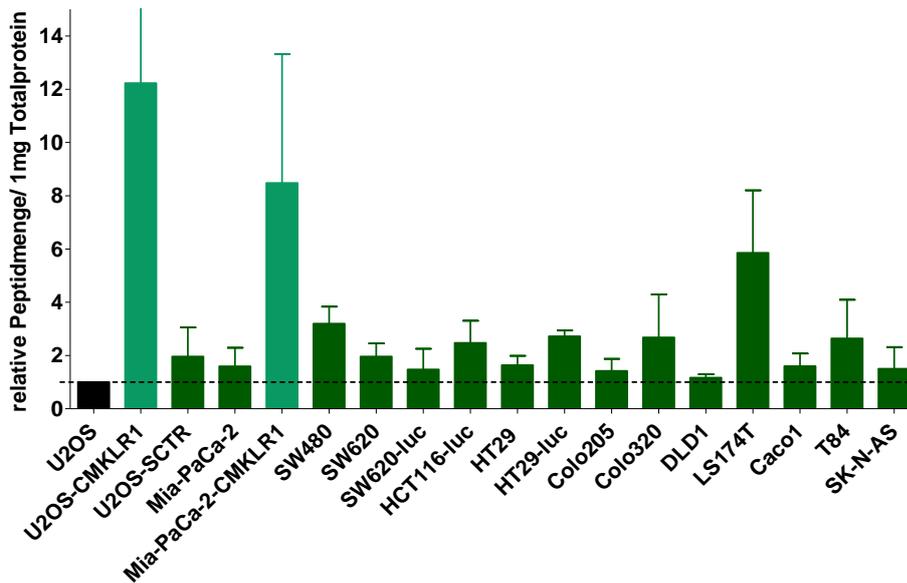


Abb. 11 ITCC-Internalisierungsassay zur Untersuchung der Bindung und intrazellulären Aufnahme von CG37 durch 12 kolorektale Adenokarzinomzelllinien. Die Zellen wurden mit CG37 ($c=100$ nM) 10 min inkubiert, danach lysiert und auf ein SDS PAGE-Elektrophoresegel aufgetragen. Die Fluoreszenzsignaldetektion erfolgte mithilfe des Odyssey-Scanners. Die Wildtypen der U2OS- und Mia-PaCa-2-Zelllinie stellten die Negativkontrolle und die mit dem CMKLR1 transfizierten Varianten die Positivkontrolle dar. Die Ergebnisse wurden als relative Peptidmenge pro 1 mg Totalprotein präsentiert, bezogen auf die absolute Peptidmenge der U2OS-Zelllinie, welche als 1 festgelegt wurde. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert, $n=3$.

Zelllinien aus, die nicht mit dem SCTR transfiziert wurden. Bei den CMKLR1-transfizierten Mia-PaCa-2-Zellen war nur ein sehr geringes Fluoreszenzsignal detektierbar. Sie nahmen trotz des Vorliegens eines Peptidrezeptors wie CMKLR1 auf ihrer Zellmembran kein anderes Peptid wie z. B. Sekretin auf, sondern erlaubten nur die spezifische Chemerin-9-Internalisierung. Anhand der Gesamtergebnisse beider Abbildungsteile konnten man die Zelllinien U2OS-CMKLR1 und Mia-PaCa-2-CMKLR1 als geeignet für die Rolle der Positivkontrollen und die Wildtypen der Zelllinien U2OS bzw. Mia-PaCa-2 als geeignete Negativkontrollen für den Internalisierungsassay mit dem fluoreszenzmarkierten Chemerin-9-Analogon CG37 erachten.

Nun wurde der etablierte Internalisierungsassay zur Untersuchung der CG37-Internalisierung durch die drei in den bisherigen Versuchen verwendeten Tumorzelllinien HCT116-luc, HT29-luc und SW620-luc sowie durch eine Reihe von weiteren kolorektalen Adenokarzinomzelllinien eingesetzt. Der **Abbildung 11** zufolge wurden insgesamt 12 unterschiedliche kolorektale Adenokarzinomzelllinien und eine Neuroblastomzelllinie im Rahmen eines Screenings getestet. Die Wildtypen der Zelllinien U2OS und Mia-PaCa-2 dienen als Negativ- und die mit dem CMKLR1 transfizierten Varianten der beiden Zelllinien als Positivkontrolle. Es wurde eine

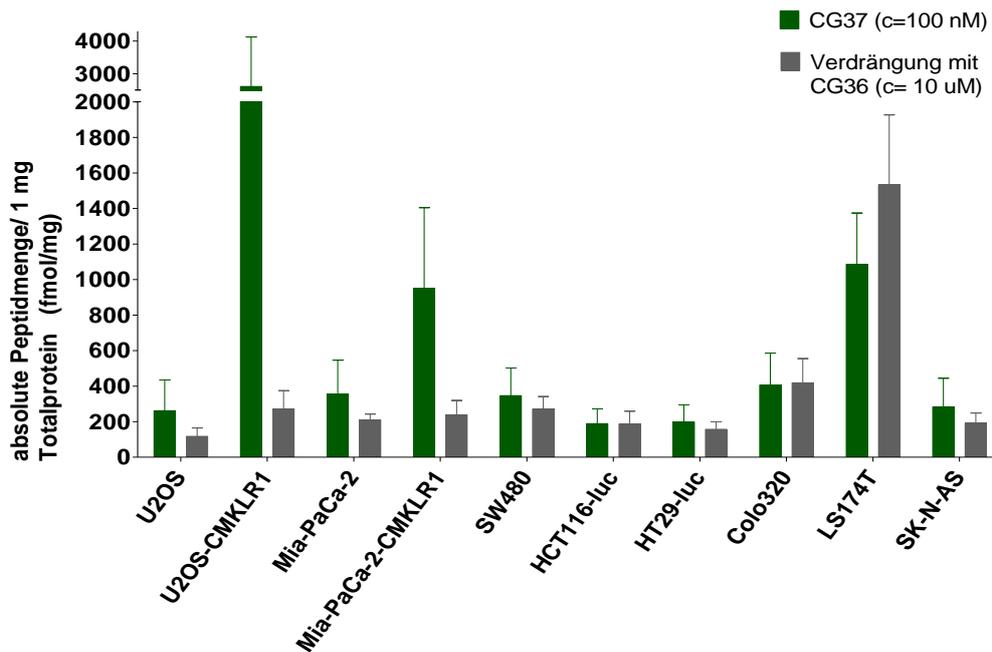


Abb. 12 Nachweis der Verdrängung des CG37 vom Chemerinrezeptor durch CG36 im Internalisierungsversuch. Es wurden zwei Platten mit den Zellen der 5 ausgewählten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien und einer Neuroblastomzelllinie sowie der U2OS- und Mia-PaCa-2-Zelllinie (Wildtypen als Negativkontrolle und die mit dem CMKLR1 transfizierten Varianten als Positivkontrolle) ausgesät. Eine Platte wurde erst mit der farbstofflosen Chemerin-9-Variante CG36 (c=10 μ M) 30 min vorinkubiert. Anschließend erfolgten CG37-Zugabe (c=100 nM) zum CG36 und Inkubation für 10 min. Die andere Platte wurde als Kontrolle nur mit CG37 (c=100 nM) für 10 min behandelt. Danach wurden die Zellen beider Platten lysiert und auf je ein SDS PAGE-Elektrophoresegel aufgetragen. Die Fluoreszenzsignaldetektion erfolgte mithilfe des Odyssey-Scanners. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert, n=3.

Normalisierung der errechneten absoluten Peptidmenge pro 1 mg Totalprotein auf den Wert des Wildtyps der Negativkontrollzelllinie U2OS durchgeführt, welcher der Wert 1 zugeordnet wurde. Die Ergebnisse wurden aus dem Grund als relative Peptidmenge pro 1 mg Totalprotein bezogen auf U2OS ausgedrückt. Die mit dem Chemerinrezeptor transfizierten Positivkontrollzelllinien erzielten einen vielfach erhöhten Internalisierungswert im Vergleich zu den beiden Negativkontrollzelllinien. Im Falle der U2OS-CMKLR1 lag die CG37-Aufnahme um das 12-fache und bei der Mia-PaCa-2-CMKLR1 um das 8-fache höher als bei dem U2OS-Wildtyp. Keine der nach CG37-Vorbehandlung detektierten relativen Peptidmengen für die einzelnen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien reichte an die von den beiden Positivkontrollzelllinien erbrachten Werte. Für sechs der 13 untersuchten Zelllinien bewegte sich die relative Peptidmenge sichtbar oberhalb der Peptidmengenwerte der beiden Negativkontrollen U2OS und Mia-PaCa-2. Bei den kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW480, HCT116-luc, HT29-luc, Colo320, LS174T und der Neuroblastomzelllinie SK-N-AS, war eine geringfügig verstärkte Aufnahme der an den ITCC-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Chemerin-9-Variante CG37 im Vergleich zu den Negativkontrollen nachweisbar.

Die sechs aufgezählten Tumorzelllinien mit dem nachgewiesenen leicht positiven Internalisierungseffekt wurden in den weiterführenden Verdrängungsversuch eingeschlossen. Der in der **Abbildung 12** beschriebene Verdrängungsversuch sollte den Spezifitätsnachweis für das bei diesen sechs Zelllinien detektierte Fluoreszenzsignal erbringen. Das Prinzip des Versuchs bestand in der Konkurrenz zwischen der vorher zugegebenen farbstofffreien Chemerin-9-Variante CG36 und dem später verabreichten CG37 um den Chemerinrezeptor CMKLR1. Die sechs Tumorzelllinien wurden zusammen mit den dazugehörigen Positiv- und Negativkontrollzelllinien U2OS-CMKLR1, Mia-PaCa-2-CMKLR1, U2OS und Mia-PaCa-2 für 30 min mit dem unmarkierten Peptid CG36 im serumfreien Medium vorinkubiert. Anschließend wurde dem Medium CG37 in der Konzentration 100 nM für 10 Minuten zugegeben. Es wurde erwartet, dass das in 100-fach höheren Konzentration vorliegende CG36 die Bindungsstellen des CMKLR1 besetzen und das später dazu kommende CG37 dadurch am CMKLR1 blockieren würde. Außerdem bereitete man eine zweite Vergleichsplatte vor, die dieselben sechs Tumorzelllinien sowie Negativ- und Positivkontrollzelllinien wie die erste Platte beinhaltete, aber ausschließlich mit CG37 in der Konzentration 100 nM 10 Minuten behandelt wurde. In der zweiten Platte sollte die in der Abbildung 11 bereits gezeigte CG37-Internalisierung ohne Verdrängung passieren. Das detektierte Signal wurde in die absolute Peptidmenge pro 1 mg Totalprotein umgerechnet. Die aus der ersten Platte mit Verdrängung stammenden Daten wurden als graue Balken dargestellt. Ihnen standen die grünen Balken gegenüber, die den Ergebnissen aus der zweiten Vergleichsplatte mit Internalisierung ohne Verdrängung (Kontrolle) entsprachen. Die Abbildung gab wieder, dass es nur bei den beiden den Chemerinrezeptor überexprimierenden Positivkontrollzelllinien U2OS-CMKLR1 und Mia-PaCa-2-CMKLR1 zu einem deutlichen Verdrängungserfolg durch den im Überschuss vorgelegenen alternativen freien Liganden CG36 kam, der sich in der großen Fluoreszenzsignalabschwächung mit erheblicher Verringerung der Höhe des grauen Verdrängungsbalkens im Vergleich zur der Höhe des grünen Balkens äußerte. Bei den kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW480, HT29-luc und der Neuroblastomzelllinie SK-N-AS erfolgte eine geringe Abnahme des Peptidmengenwertes nach der Verdrängung mit CG36 im Vergleich zu den daneben stehenden, grünen CG37-Internalisierungswerten ohne Verdrängung. Bei den übrigen aufgeführten kolorektalen Tumorzelllinien ereignete sich keine Signalabschwächung im Verdrängungsversuch, der grüne und der graue Balken glichen einander. LS174T wiesen sogar eine Zunahme der detektierten Peptidmenge nach der Verdrängung auf.

Diese Untersuchungen an isolierten Zellkulturen ergaben mithin keinen unmittelbaren Hinweis auf eine hohe selektive Bindung und Aufnahme von Chemerin in kolorektale Adenokarzinomzelllinien über den CMKLR1. Dennoch sollte im Weiteren die vorab aufgeworfene Hypothese überprüft werden, dass fluoreszenzmarkierte Chemerinanaloga im Mausmodell für die Tumorbildgebung genutzt werden könnten. Eine verstärkte Chemerin-9-Aufnahme in subkutane Xenograft-Tumoren ist wesentlich komplexeren Einflussfaktoren unterworfen als die bloße Bindung und Internalisierung an Zellen in der Kulturschale. Die weitere Verfolgung dieser Fragestellung erschien daher auch im Lichte der Vorversuche als legitim und klärens Wert.

4.4 *In-vivo*-Bildgebung der Chemerin-9-Aufnahme

Bei allen aus den bisher durchgeführten Experimenten zur Chemerin-9-Internalisierung generierten Ergebnissen handelte es sich um *in-vitro*-Daten. In den nachfolgenden Versuchen wurde deswegen der Nachweis einer Aufnahme bzw. Akkumulation von Chemerin-9 in die Tumorzellen *in vivo* nach intravenöser Gabe angestrebt.

Wir verwendeten ein Xenograft-Mausmodell, in dem wir den Nacktmäusen humane Tumore durch subkutane Injektion von kolorektalen Adenokarzinomzelllinien setzten. Um die uns interessierende Chemerin-9-Aufnahme in die subkutanen Tumore in einer lebenden Nacktmaus messen zu können, bedienten wir uns einer *in-vivo*-Bildgebung. Die Aufnahme von Chemerin-9 wurde mittels der Nahinfrarotbildgebung *in vivo* dargestellt. Dazu wurde den tumortragenden Nacktmäusen das an den NIR-Farbstoff gekoppelte Peptid (CG37) intravenös injiziert. 24 Stunden nach der Injektion wurde die Bildgebung an dem Nahinfrarot-Bildgebungssystem Pearl durchgeführt. Die **Abbildung 13** bietet einen repräsentativen Einblick in die Ergebnisse der *in-vivo*-Bildgebung. Insgesamt wurde die Akkumulation von CG37 in fünf verschiedenen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien untersucht, semiquantitativ ausgewertet und das Signalverhältnis (Ratio) von Tumor und Hintergrund bestimmt (**Abb 13C**). Es handelte sich um die luc-Varianten und Wildtypen der bereits in den bevorzogenen *in-vitro*-Versuchen untersuchten Tumorzelllinien HCT116, HT29 und SW620. Von der HCT116-Zelllinie stand nur der luc-Klon zur Verfügung. Die **Abbildung 13A** zeigt repräsentativ das Bild einer Maus mit zwei sich an den Flanken befindlichen Tumoren in der Weißlichtdarstellung des *in-vivo*-Imaginggeräts. In der **Abbildung 13B** wurde entsprechend die Fluoreszenzaufnahme in der Grünlichtdarstellung (800 nm) derselben Maus dargestellt. Man erkannte eine deutliche Fluoreszenzsignalanreicherung in den beiden grün leuchtenden, weiß umkreisten Tumoren.

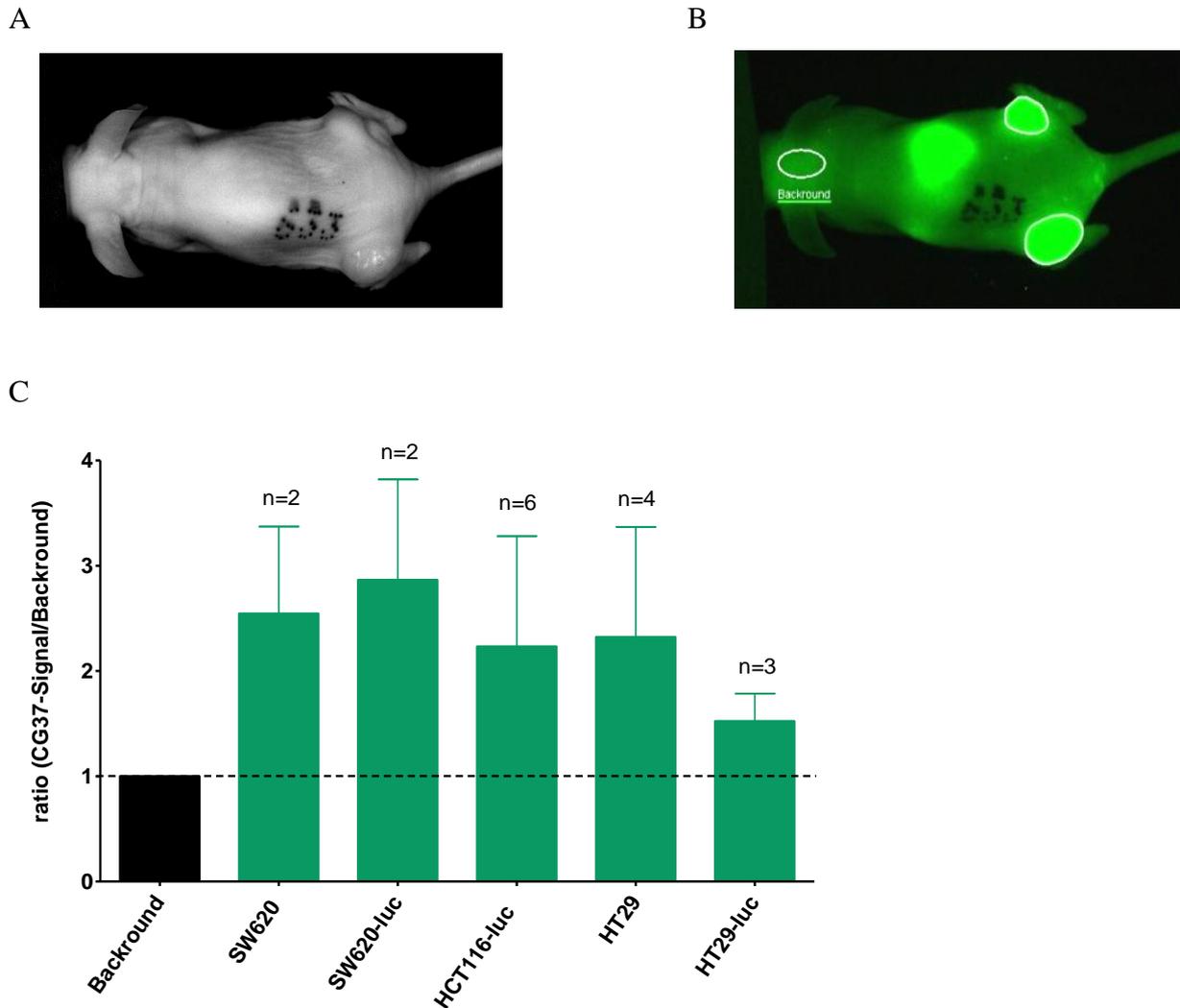


Abb. 13 Ergebnisse der *in-vivo*-Bildgebung zum Nachweis der Chemerinaufnahme in die kolorektalen Tumore. Insgesamt wurden 5 kolorektale Adenokarzinomzelllinien getestet. Dazu wurden den Mäusen pro Zelllinie 5 Mio. Zellen s.c. injiziert. Repräsentative Aufnahmen in der (A) Weißkanaldarstellung und der (B) 800 IF-Grünkanaldarstellung. Nach 2 Wochen erfolgte eine i.v. Injektion von 2 nmol CG37 (ITCC-Farbstoff gekoppelte Chemerin-9-Variante) pro Maus. Die Nahinfrarotbildgebung wurde 24 h danach durchgeführt. (C) Semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale für die einzelnen Tumorzelllinien. Zur Ergebnisgenerierung wurde ein Quotient aus dem CG37-Fluoreszenzsignal und dem Hintergrundsignal, welches 1 entsprach, gebildet. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert, $n \geq 2$.

Ebenfalls detektierbar war eine Signalanreicherung in der Leber. Die definierte RIO (Region of interest), die mit einem weißen Ring im Nacken der Maus markiert wurde, entsprach dem Hintergrundfluoreszenzsignal. Für die semiquantitative Auswertung der mit *in-vivo*-Bildgebung gewonnenen Fluoreszenzsignale für die verschiedenen kolorektalen Tumorzelllinien **Abb. 13C**) wurde eine Ratio gebildet. Die Ratio ist ein Quotient aus dem im Tumor detektierten CG37-Fluoreszenzsignal und dem dazugehörigen Hintergrundsignal. In der Abbildung wurde das Hintergrundsignal als schwarzer Balken veranschaulicht. Die grünen Balken symbolisierten die Signalwerte für die unterschiedlichen kolorektalen Tumorzelllinien.

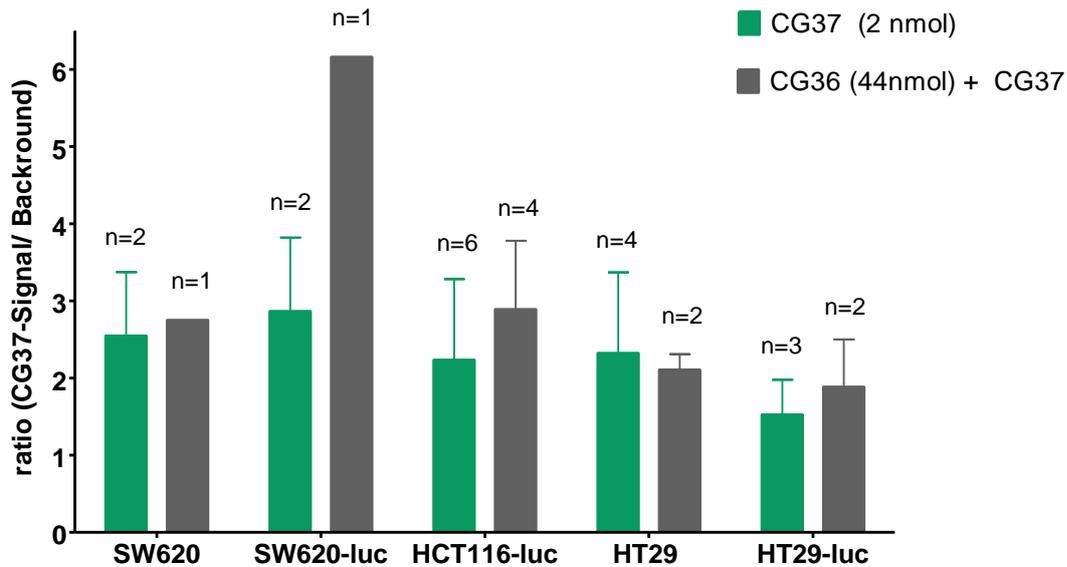


Abb. 14 Versuch zur *in-vivo*-Verdrängung des CG37 vom Chemerinrezeptor durch Vorbehandlung mit CG36. Es wurden 5 kolorektale Adenokarzinomzelllinien untersucht. Dazu wurden den Mäusen pro Zelllinie 5 Mio. Zellen s.c. injiziert. Nach 3 Wochen erfolgte erst eine i.v.-Injektion von 44 nmol CG36 (nicht Fluoreszenzfarbstoff-markierte Chemerin-9-Variante) pro Maus, gefolgt von einer 1 h später stattgefundenen i.v.-Injektion von 2 nmol CG37 (ITCC-gekoppelten Chemerin-9-Variante). Die Nahinfrarotbildgebung wurde 24 h danach durchgeführt. Es sind die Fluoreszenzsignale für die einzelnen Tumore vor bzw. nach der stattgefundenen Verdrängung mit CG36 gegenübergestellt. Es erfolgte eine semiquantitative Auswertung, bei der ein Quotient aus dem CG37-Fluoreszenzsignal und dem Hintergrundsignal gebildet wurde. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert, $n \geq 1$.

Oben wurde die Anzahl der untersuchten Tumore pro Zelllinie aufgeschrieben. Bei allen fünf getesteten Tumorzelllinien bewegte sich die Ratio oberhalb vom Wert 1 des Hintergrundsignals. Dabei wiesen die HT29-luc die geringste (Ratio= 1,5) und SW620-luc die höchste Signalanreicherung (Ratio= 3) auf. Die semiquantitative Auswertung demonstrierte, dass alle untersuchten Tumore über eine nachgewiesene CG37-Signalanreicherung verfügten.

Äquivalent zu den oben aufgeführten *in-vitro*-Verdrängungsversuchen wurden auch im Tiermodell Verdrängungsversuche unternommen, um die Spezifität der CG37-Aufnahme in die Tumore zu verifizieren. Dazu wurden tumortragenden Mäusen nach der Auswaschung des CG37 aus dem Vorversuch (7 Tage später) zunächst 44 nmol des fluoreszenzfarbstofffreien Peptids CG36 intravenös injiziert. Nach einer Stunde wurden 2 nmol vom CG37 zusätzlich in die Schwanzvene gespritzt. Nach 24 Stunden wurde die *in-vivo*-Bildgebung durchgeführt. Die **Abbildung 14** setzt sich zusammen aus den in der Abbildung 13 bereits präsentierten und hier als grüne Balken dargestellten Daten sowie den aus dem Verdrängungsversuch kommenden als graue Balken dargestellten Ergebnissen. Der entsprechende Verdrängungsversuch wurde für alle fünf kolorektalen, im vorherigen Experiment untersuchten Tumorzelllinien durchgeführt. Die

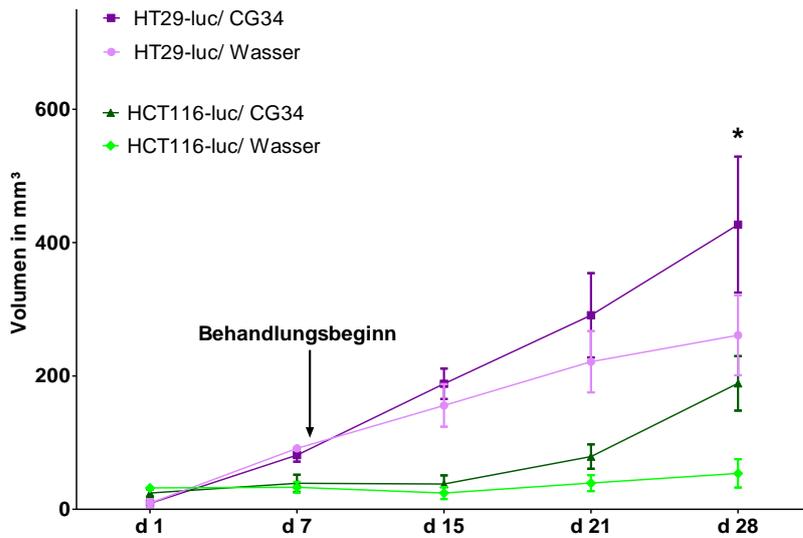
Versuchszahlen pro Zelllinie sind oberhalb des jeweiligen Balkens zu finden. Zur Ergebnisgenerierung verwendete man wieder die Ratio. Den Ergebnissen war zu entnehmen, dass die nach der Verdrängung mit CG36 stammenden Werte für die Zelllinien oberhalb des Hintergrundwertes von 1 lagen. Es konnte somit auch unter Blockade von CMKLR1-Bindungsstellen durch einen 22-fachen Überschuss von CG36 eine gleich hohe oder sogar etwas höhere CG37-Aufnahme in die Tumore erfasst werden. Lediglich bei der Zelllinie HT29 konnte eine sehr geringe Fluoreszenzsignalabschwächung nach der Verdrängung im Vergleich zu dem gegenübergestellten, die Daten ohne eine vorhergehende CG36-Behandlung symbolisierenden grünen Balken festgestellt werden. Bei allen weiteren Zelllinien wurde eine der CG36-Zugabe folgende Signalverstärkung dokumentiert: die grauen Balken des Verdrängungsversuchs überragten die grünen Balken, die den Ergebnissen ohne Verdrängung entsprachen.

Zusammenfassend wurde festgehalten, dass bei allen fünf subkutan injizierten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien eine unterschiedlich starke CG37-Aufnahme in die Tumore gemessen werden konnte. Diese Aufnahme konnte jedoch unter den eingesetzten Versuchsbedingungen nicht durch das unmarkierte Peptid (CG36) verdrängt werden, sie könnte daher wahrscheinlich nicht durch selektive, rezeptorvermittelte Prozesse erfolgen. Es wurde aber von einem möglichen, bereits in den *in-vitro*-Experimenten gezeigten Einfluss des in den Tumoren akkumulierten Chemerin-9 auf das Tumorstadium *in vivo* ausgegangen. Deshalb wurde die Durchführung eines Behandlungsversuchs mit dem Chemerin-9 zur Klärung der sich vor uns eröffneten Frage nach dem die Tumorstadium *in vivo* stimulierenden Effekt von Chemerin-9 als angebracht gesehen.

4.5 Behandlungsversuch mit Chemerin-9

Der Interventionsversuch mit Chemerin-9 sollte uns befähigen die Fragestellung nach der tumorregulatorischen Wirkung von Chemerin-9 *in vivo* zu beantworten. Es wurde entsprechend den vorhergehenden *in-vitro*-Versuchen von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass die Behandlung von immunkompromittierten Mäusen mit subkutan injizierten kolorektalen Tumoren mit Chemerin-9 das Wachstum dieser Tumore beschleunigen und das Tumorstadium bzw. -gewicht im Vergleich zu der nicht behandelten Negativkontrolle steigern würde. Andererseits könnten jedoch Chemerinwirkungen auf das tumorumgebende Mikromilieu (Gefäßbildung, Immunzellinfiltration, tumorassoziierte Fibroblasten) bzw. der dreidimensionale Gewebekontext zur kompensatorischen Hemmwirkung auf das Tumorstadium *in vivo* führen.

A



B

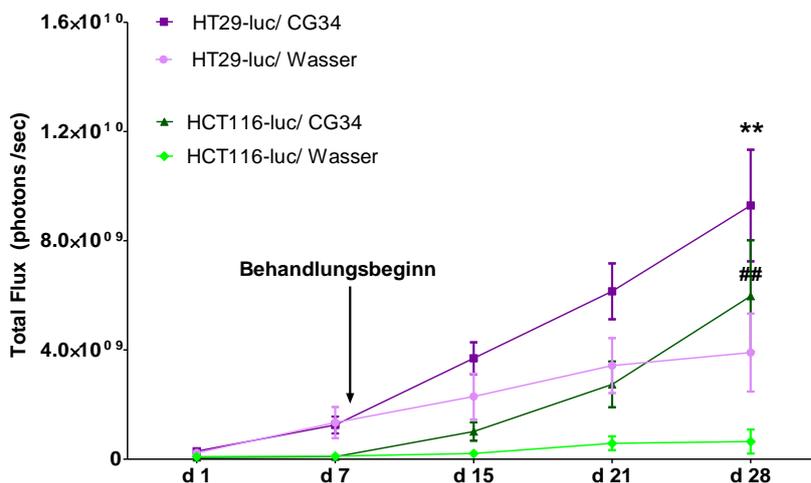


Abb. 15 Ergebnisse des Behandlungsversuchs mit CG34 (stabile Chemerin-9-Variante). (A) Tumorvolumenverlauf in der Kontroll- und Behandlungsgruppe für zwei kolorektale Adenokarzinom-Xenografts. (B) Tumorwachstumsmonitoring mit Biolumineszenz. 12 Mäusen wurden zwei kolorektale Adenokarzinomzelllinien s.c. (5 Mio. Zellen pro Zelllinie) injiziert, HT29-luc in die linke und HCT116-luc in die rechte Flanke. Am Tag des Behandlungsbeginns (8. Versuchstag) wurden die Mäuse in zwei Gruppen (6 Tiere pro Gruppe) randomisiert. Die Intervention verlief 23 Tage lang unter verblindeten Bedingungen. Eine Gruppe erhielt einmal täglich eine i.p.-Injektion mit 200 µl CG34 und die andere mit 200 µl Wasser. Die Größenmessung zur Tumorumfangberechnung sowie Biolumineszenz-Bildgebung wurden seit dem Versuchsstart einmal wöchentlich durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM präsentiert. Die Auswertung erfolgte mit two way ANOVA, gefolgt vom Bonferroni-Post-Test, $p < 0,05$. **/###: $p < 0,01$

Wir konzipierten zu Bearbeitung der aufgestellten Hypothese einen Behandlungsversuch, an dem insgesamt 12 Nacktmäuse teilnahmen. Um einen Vergleich zu den *in-vitro*-Daten zu ermöglichen, wurden die Tumore zweier schon bisher verwendeter kolorektaler

Adenokarzinomzelllinien HCT116-luc und HT29-luc in immunsupprimierte Nacktmäuse inokuliert. Da es sich um die Luziferase-exprimierende Tumorzellen handelte, konnte das Wachstum der Tumore neben der Größenmessung auch über die Biolumineszenz-Bildgebung verfolgt werden. Am achten Versuchstag wurde die Therapie eingeleitet. Sie erfolgte unter verblindeten Bedingungen, wobei den Mäusen einmal täglich 200 µl einer Lösung intraperitoneal injiziert wurden. Eine Gruppe erhielt die Behandlung mit 50 nmol einer stabilen wasserlöslichen Chemerin-9-Variante CG34 und der Kontrollgruppe wurde Wasser verabreicht.

In **Abbildung 15** sind Ergebnisse des Tumorgrößenmonitorings mit zwei verschiedenen Messverfahren der Kallipermessung und der Biolumineszenz-Bildgebung aufgeführt. Das Tumorgrößenmonitoring wurde ab dem ersten Versuchstag einmal wöchentlich durchgeführt. Im **Teil A** findet man die Daten aus der Tumorumfangbestimmung mithilfe der Kallipermessung für zwei kolorektale Adenokarzinomzelllinien. In der **Abbildung 15B** wurden die Ergebnisse der alternativen Wachstumsmessung mit der Biolumineszenz-Bildgebung dargestellt. Die Ergebnisse aus der Biolumineszenzmessung wurden als totale Photonenemission pro Sekunde präsentiert. Über den von einem Tumor ausgehenden Photonenfluss und die damit einhergehende Photonenausbeute konnte man auf die Tumorgröße schließen. Die lilafarbenen Kurven bezeichneten den Tumorumfangverlauf für die Zelllinie HT29-luc und die grünen für die Zelllinie HCT116-luc. Die hellere Kurve gehörte zur jeweiligen Kontrollgruppe und die dunkle Kurve zu der Behandlungsgruppe für den jeweiligen Tumor. Die HT29-luc-Tumore der Tiere, die mit CG34 behandelt wurden, nahmen nach dem Interventionsstart im Verlauf des Experiments schneller an Tumorumfang zu (lila Kurve) als die Tumore der nicht behandelten Tiere (rosa Kurve). Es drückte sich in dem steileren Kurvenverlauf für das Tumorumfang sowie für das mit der Tumorgröße korrelierende Biolumineszenzsignal der Behandlungsgruppe verglichen mit dem Kurvenverlauf der Kontrollgruppe aus. Am letzten Messtag wurde ein statistisch signifikanter Unterschied in der Tumorgröße zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe für HT29-luc mit beiden Messmethoden erfasst. Alle Tumore der Zelllinie HCT116-luc besaßen ein kleineres Tumorumfang und sandten wegen der geringeren Tumorgröße weniger Photonen pro Sekunde als die Tumore der Zelllinie HT29-luc aus. Zwischen den Tumoren der CG34-Behandlungs- und Kontrollgruppe der HCT116-luc (grüne Kurven) bestanden jedoch große Unterschiede. Der Kurvenverlauf für das Tumorumfang der Behandlungsgruppe zeichnete sich durch einen größeren Anstieg als der Kurvenverlauf der Kontrollgruppe aus. In Bezug auf die Biolumineszenzmessung verlief der totale Photonenfluss für die mit CG34 therapierten Tumore seit dem Behandlungsbeginn immer höher als der totale Photonenfluss, der von den nur mit Wasser behandelten Tumoren ausgestrahlte. Am Tag

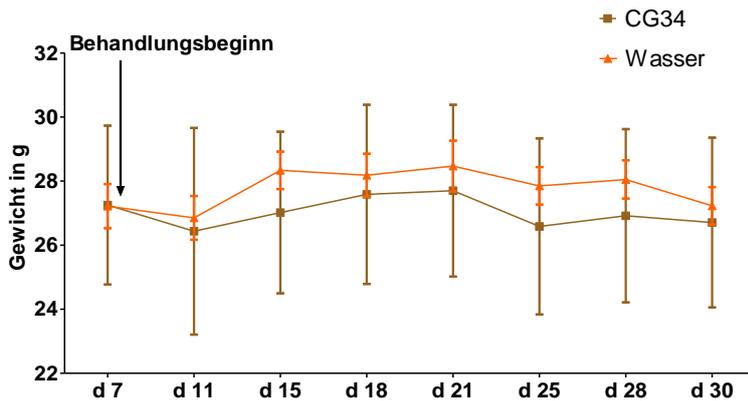


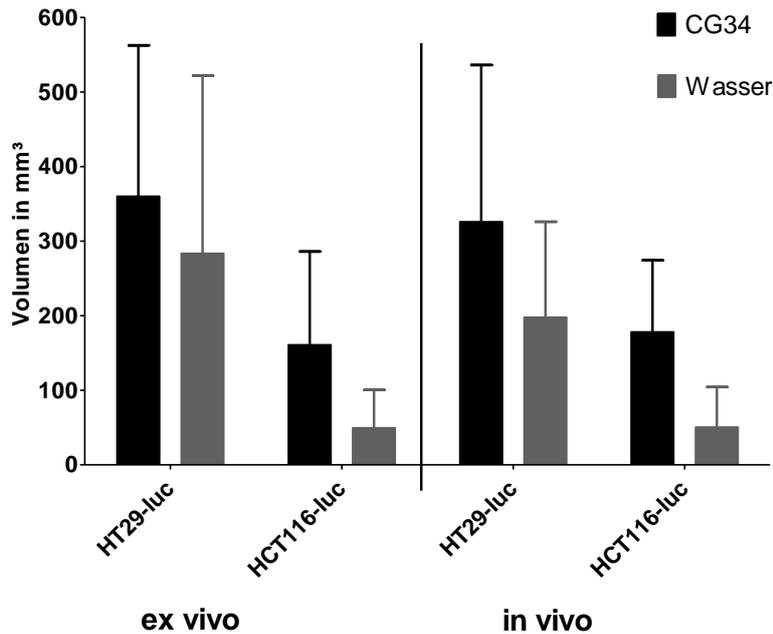
Abb. 16 Gewichtsverlauf in der Kontroll- und Behandlungsgruppe im Behandlungsversuch. Jeder der insgesamt 12 untersuchten Mäuse wurden Tumore zweier kolorektaler Adenokarzinomzelllinien s.c. (5×10^6 Zellen pro Zelllinie) injiziert, HT29-luc in die linke und HCT116-luc in die rechte Flanke. Am Tag des Behandlungsbeginns (8. Versuchstag) wurden die Mäuse in zwei Gruppen (6 Tiere pro Gruppe) randomisiert. Die Behandlung verlief 23 Tage lang unter verblindeten Bedingungen. Eine Gruppe erhielt einmal täglich eine i.p.-Injektion mit 200 μ l CG34 (stabile Chemerin-9-Variante) und die andere mit 200 μ l Wasser. Die Gewichtsbestimmung erfolgte seit dem Therapiebeginn 2 Mal wöchentlich. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert.

28 wurden bei der Behandlungsgruppe ein signifikant größerer Photonenfluss pro Sekunde und eine damit verbundene signifikant höhere Tumorgroße als bei der Kontrollgruppe detektiert.

Zusätzlich wurde das Gewicht der Nacktmäuse zwei Mal in der Woche ermittelt. Die **Abbildung 16** resümiert die Ergebnisse des Gewichtsmonitorings für die CG34-Behandlungs- und Kontrollgruppe. Es waren lediglich kleine Gewichtsvariationen in beiden Gruppen zu verzeichnen. Zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede im Gewichtsverlauf. Das mittlere Mäusegewicht blieb stabil und sank geringfügig in beiden Gruppen bei der Messung am Versuchsendpunkt ab, was am ehesten mit dem Setting am letzten Versuchstag vor der Tötung und damit verbundener Stresssituation zusammenhing.

Am Versuchsendpunkt, nach insgesamt 31 Versuchstagen wurden alle Mäuse getötet. Danach wurde die Ermittlung des Tumolvolumens mit dem Messschieber *in vivo* vorgenommen. Anschließend wurden die Tumore im Rahmen einer Sektion entnommen und *ex vivo* nochmals mit dem Messschieber gemessen. Die Ergebnisse der Tumolvolumenbestimmung *in* und *ex vivo* wurden in der **Abbildung 17A** miteinander verglichen. Die Daten für das Tumolvolumen *in vivo* sowie *ex vivo* verhielten sich bei beiden kolorektalen Tumorzelllinien ähnlich. Nach der *in-vivo*-sowohl als auch *ex-vivo*-Messung wurde erkennbar, dass bei HCT116-luc bzw. HT29-luc die Behandlungsgruppe einen höheren Mittelwert für das Tumolvolumen als die Kontrollgruppe aufwies. Im Falle der Zelllinie HCT116-luc war ein viel größerer Tumolvolumenunterschied zwischen den beiden Gruppen sichtbar als bei HT29-luc. Zusätzlich zur Tumolvolumenermittlung wurde nach der Sektion das Gewicht der einzelnen Tumore bestimmt

A



B

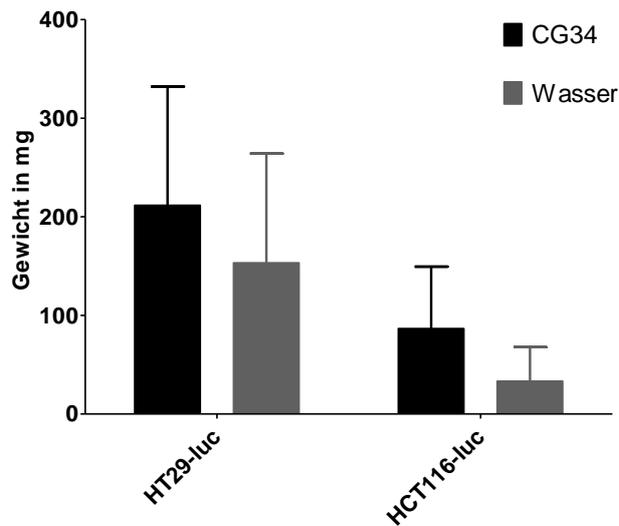


Abb. 17 Ergebnisse zum Endpunkt des Behandlungsversuchs mit CG34 (stabile Chemerin-9-Variante). (A) Tumorzellen und (B) Tumorgewicht in der Kontroll- und Behandlungsgruppe für zwei kolorektale Adenokarzinom-Xenografts. Die i.p. Behandlung mit 200 µl CG34 bzw. Wasser wurde am 30. Versuchstag beendet. Die insgesamt 12 Mäuse (6 Mäuse pro Gruppe) wurden getötet und die Tumore wurden entnommen. Tumorzellenbestimmung wurde mittels einer Kallipermessung der Tumore an den toten Mäusen (*in vivo*) und einer Kallipermessung der in der Autopsie entnommenen Tumore (*ex vivo*) vorgenommen. Die Daten wurden als Mittelwert ± SD präsentiert.

(**Abb. 17B**). Die HCT116-luc-Tumore wogen viel weniger als die HT29-luc-Tumore, denn die HCT116-luc-Tumore verfügten entsprechend den Ergebnissen der Kallipermessungen zusätzlich über ein kleineres Tumorzellen als die Tumore der Zelllinie HT29-luc. Für die beiden

kolorektalen Zelllinien wurde ein höheres mittleres Tumorgewicht in der CG34-Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt.

Um eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede beim Tumolvolumen bzw. -gewicht zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe zu finden, wurde eine histologische Untersuchung der in der Autopsie entnommenen Tumore als sinnvoll betrachtet. Im Folgenden sollten die Tumore auf Nekrose und Vaskularisierung hin untersucht werden: Zur Evaluation dieser Parameter wurden Schnitte von den Kryotumorpräparaten angefertigt, welche anschließend histologischen, immunohistochemischen sowie Immunfluoreszenz-Färbungen unterzogen wurden. Um sich eine Übersicht über die Tumormikroanatomie und Nekrose in den Tumoren zu verschaffen, wurde eine HE-Färbung als erstes durchgeführt. Zur Darstellung der Gefäße bediente man sich einer immunhistochemischen Gefäßfärbung mit einem anti-Maus-Antikörper gegen einen Oberflächenmarker für die Endothelzellen CD31. Die Proliferationsfraktion sollte mit Hilfe der Anfärbung der teilungsaktiven Tumorzellen mit dem anti-Human-Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki67 beurteilt werden. Das Vorhandensein von Immunzellen im sowie um das Tumorgewebe herum wurde mit der Immunfluoreszenz mit dem anti-Maus-Antikörper gegen CD45, ein Oberflächenprotein auf der Lymphozytenzellmembran, geprüft. Die CD45 exprimierenden Lymphozyten wurden rot und die Tumorzellkerne mittels DAPI-Gegenfärbung blau angefärbt.

Die **Abbildungen 18** und **19** veranschaulichen die Ergebnisse der durchgeführten verschiedenen Färbungen für die HT29-luc- und HCT116-luc-Tumore. Links befinden sich die repräsentativen Aufnahmen von einem Tumor aus der CG34-Behandlungsgruppe. Ihnen gegenüber stehen auf der rechten Abbildungsseite die repräsentativen Aufnahmen für einen Tumor aus der Kontrollgruppe. Bei der Betrachtung der Aufnahmen für die kolorektale Tumorzelllinie HT29-luc sah man in der HE-Färbung, dass die Tumorzellen sich in Form von Drüsen mit einem erkennbaren Lumen gruppierten. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis lag zu Gunsten des Zytoplasmas, die Zellkerne waren nicht sehr groß. Die drüsenartigen Tumorzellformationen lagen in der Behandlungs- sowie Kontrollgruppe vor. Nekrosezeichen waren in beiden Gruppen auf den HE-Aufnahmen nicht erkennbar. Die Anzahl der mit dem CD31-Antikörper rötlich angefärbten Gefäße könnte bei der Betrachtung der gegenüber gestellten Aufnahmen in der Behandlungsgruppe etwas höher als in der Kontrollgruppe sein. Die Zahl der proliferierenden mit Ki67-Antikörper markierten Tumorzellen variierte beim Anblick der Aufnahmen mit dem bloßen Auge nicht zwischen den beiden Gruppen. Den unten stehenden Immunfluoreszenzbildern entnahm man, dass die CD45 tragenden Lymphozyten sich um den blau gefärbten Tumor herum versammelten, eine Einwanderung ins Tumorgewebe fand nicht

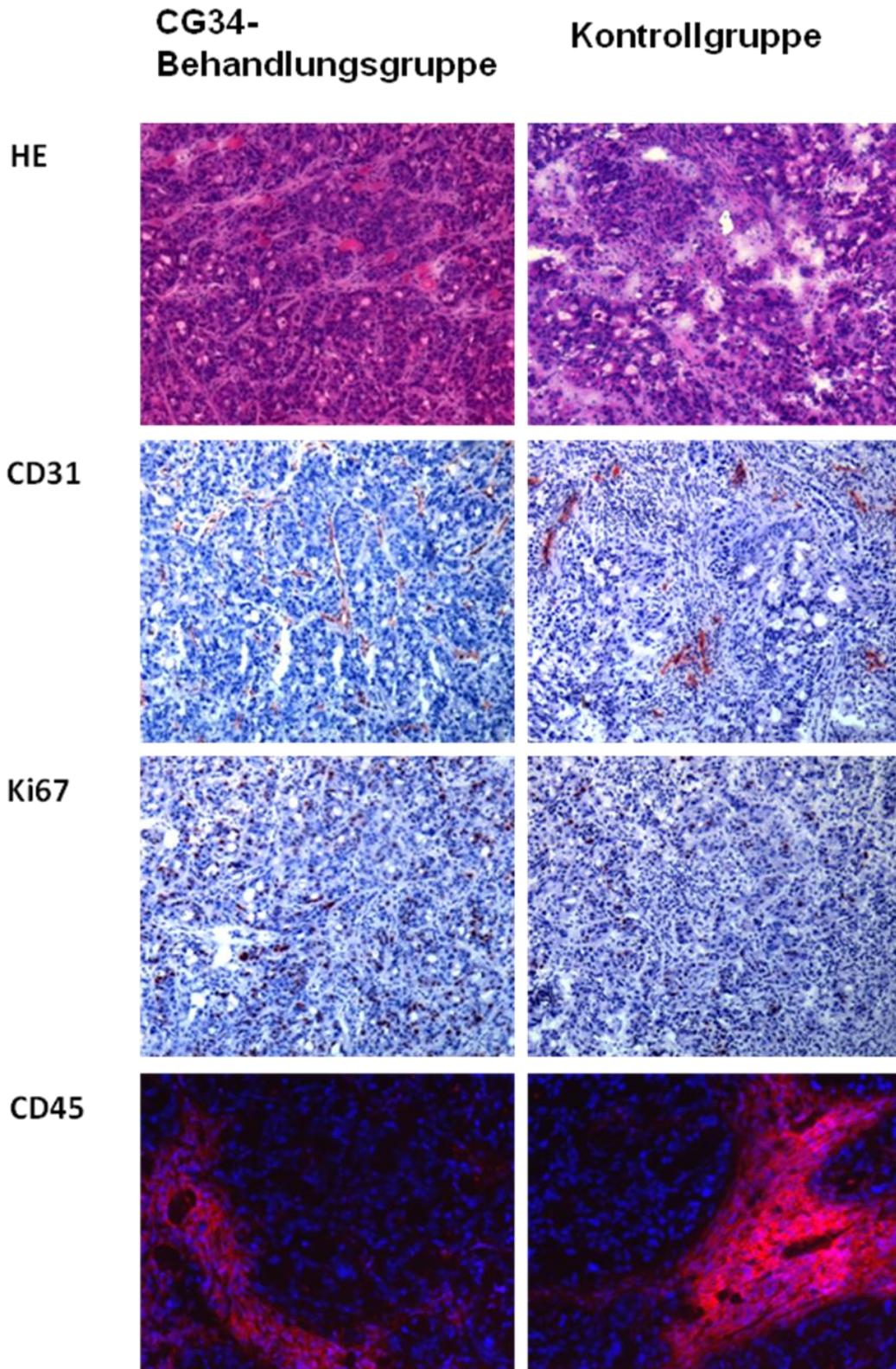


Abb. 18 Histologie der HT29-luc-Tumore aus dem Behandlungsversuch. Die auf der linken Seite der Abbildung stehenden Aufnahmen sind repräsentativ für einen Tumor aus der Behandlungsgruppe und die Aufnahmen von der rechten Seite für einen Tumor aus der Kontrollgruppe. Alle Aufnahmen erfolgten mit einem Fluoreszenz-/Lichtmikroskop, HE-, CD31-, Ki67-Färbung in der 10-fachen und CD45-Färbung in der 20-fachen Objektivvergrößerung.

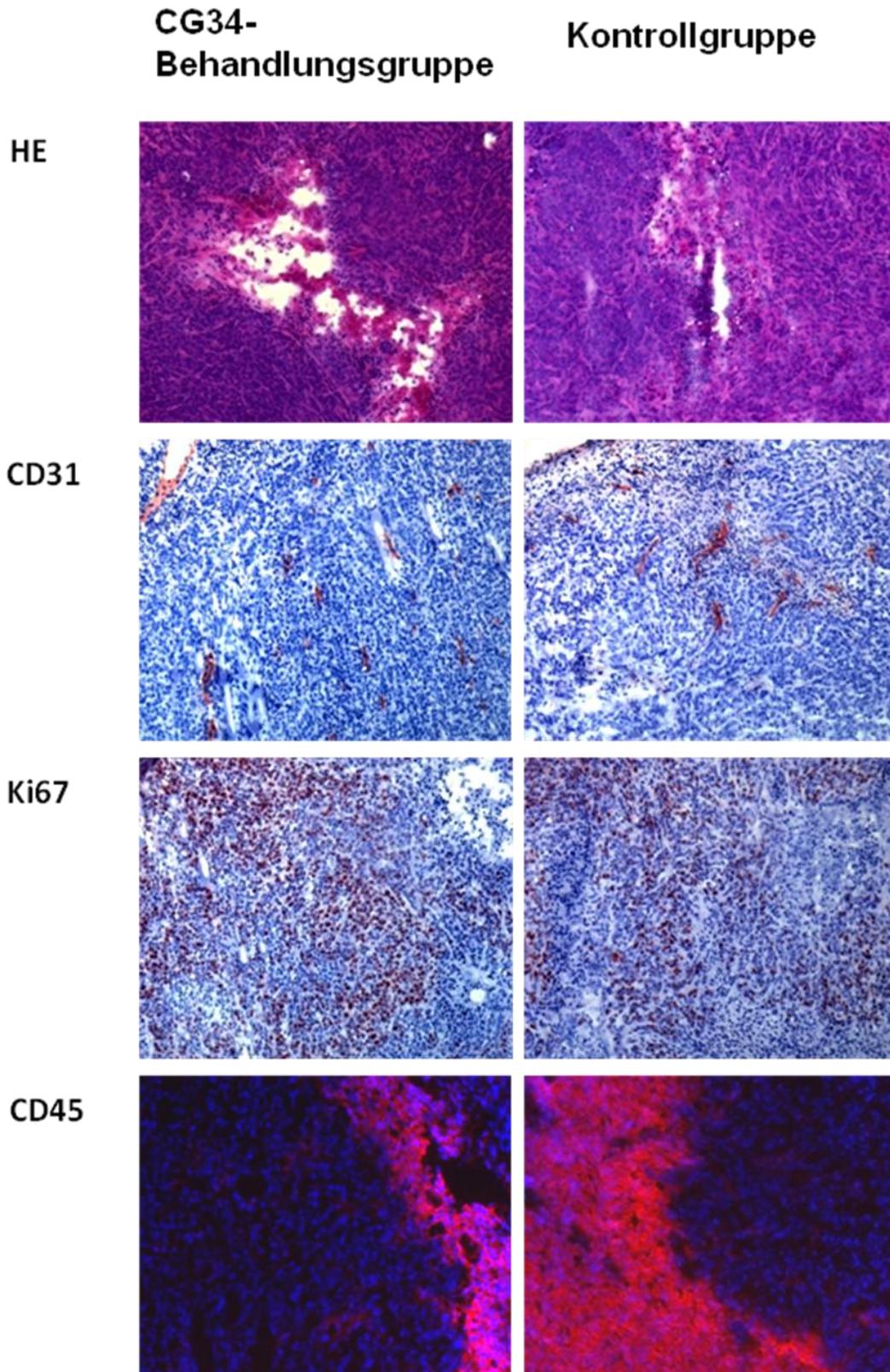


Abb. 19 Histologie der HCT116-luc-Tumore aus dem Behandlungsversuch. Die auf der linken Seite der Abbildung stehenden Aufnahmen sind repräsentativ für einen Tumor aus der Behandlungsgruppe und die Aufnahmen von der rechten Seite für einen Tumor aus der Kontrollgruppe. Alle Aufnahmen erfolgten mit einem Fluoreszenz-/ Lichtmikroskop, HE-, CD31-, Ki67-Färbung in der 10-fachen und CD45-Färbung in der 20-fachen Objektivvergrößerung.

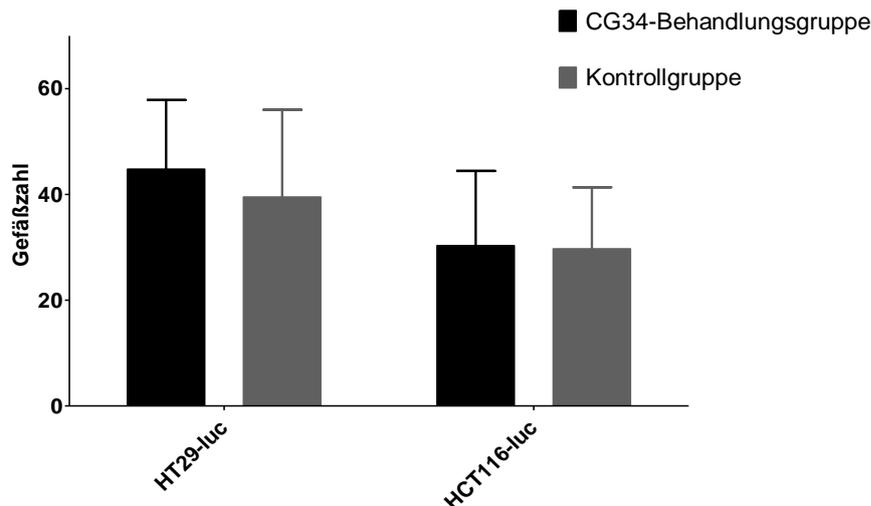


Abb. 20 Bestimmung der Gefäßanzahl in den Tumoren aus dem Behandlungsversuch. Es wurde von den Kryoschnitten der entnommenen Tumore eine immunohistochemische CD31-Färbung zur Gefäßdarstellung angefertigt. Es wurden insgesamt vier bzw. drei vergleichbare Blickfelder pro Tumorpräparat mit dem Lichtmikroskop in der 20-fachen Objektivvergrößerung aufgenommen. In jedem Blickfeld wurden mithilfe des Programms Image J die Gefäße gezählt. Die Gefäßanzahl für die Tumore aus der Behandlungsgruppe (schwarze Balken) wurde mit der Gefäßanzahl für die Kontrollgruppe (graue Balken) verglichen. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert.

statt. Dieser Befund galt für beide Gruppen. Bei der Ansicht der Aufnahmen für die kolorektale Adenokarzinomzelllinie HCT116-luc (**Abb. 19**) wurde überwiegend in der HE-Färbung erkennbar, dass die HCT116-luc-Zellen im Vergleich zu den oben beschriebenen HT29-luc-Zellen keine drüsige Struktur aufwiesen, sondern als eine Masse von vielen nebeneinander liegenden Tumorzellen vorlagen. HCT116-luc-Zellen waren auch kleiner als die HT29-luc-Zellen und hatten eine sich durch einen großen Zellkern kennzeichnende Kern-Zytoplasma-Relation. HCT116-luc-Tumore wiesen Nekrosen im Tumorrinneren auf. Zwischen den HE-Aufnahmen für die HCT116-luc-Tumore aus den beiden Behandlungsversuchsgruppen bestanden keine erkennbaren Unterschiede in der Zellstruktur sowie dem Nekrosemuster. Die Gefäßzahl und -verteilung unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den untersuchten Versuchsgruppen. Es waren mehr Ki67-angefärbte Tumorzellen in der Behandlungsgruppe als bei der Kontrollgruppe sichtbar. Ähnlich wie bei HT29-luc-tumoren umrangen zwar die CD45 markierten Lymphozyten die HCT116-luc- Tumore beider Versuchsgruppen, drangen jedoch nicht in das Tumorgewebe ein. Da man sich bei der Bewertung der CD31- und Ki67-Färbungen lediglich auf das subjektive Betrachterauge verlassen konnte, sahen wir die Notwendigkeit die Unterschiede in der Gefäßzahl sowie der Zahl der proliferierenden, Ki67 positiven Tumorzellen für beide Tumorarten in beiden Versuchsgruppen zu quantifizieren.

Die **Abbildung 20** demonstriert die Ergebnisse der angesprochenen Gefäßzahlquantifizierung für beide Tumorzelllinien. Dazu wurden für jedes Tumorpräparat 3 bis 4 Blickfelder unter 20-

Ergebnisse

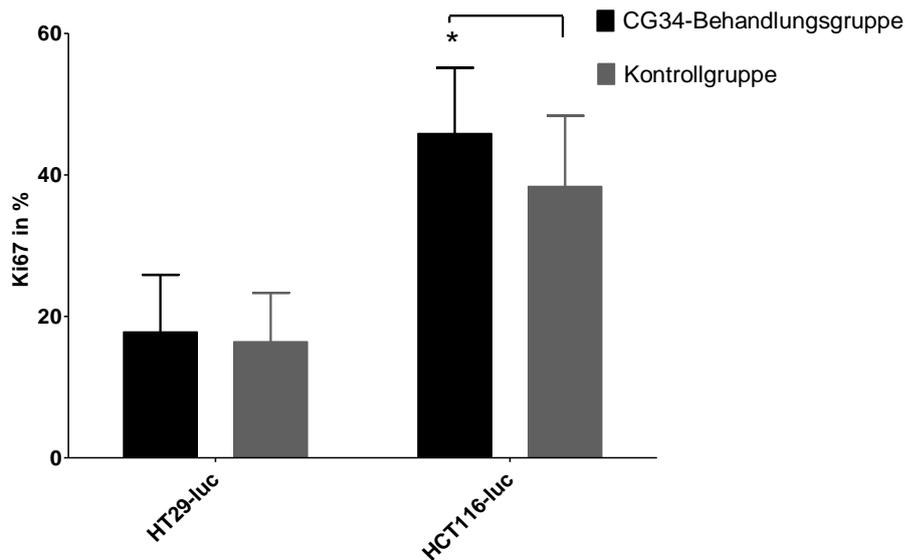


Abb. 21 Quantitative Ki67-Bestimmung in den Tumoren aus dem Behandlungsversuch. Es wurde von den Kryoschnitten der entnommenen Tumore eine immunohistochemische Ki67-Färbung angefertigt. Es wurden insgesamt vier bzw. drei vergleichbare Blickfelder pro Tumorpräparat mit dem Lichtmikroskop in der 20-fachen Objektivvergrößerung aufgenommen. Für jedes Blickfeld wurde mithilfe des Programms Image J Ki67 in Prozent ermittelt. Die Ki67-Rate für die Tumore aus der Behandlungsgruppe (schwarze Balken) wurde mit der Ki67-Rate für die Kontrollgruppe (graue Balken) verglichen. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD präsentiert. Die Auswertung erfolgte mit two way ANOVA, gefolgt vom Bonferroni-Post-Test, $p < 0,05$.

facher Objektivvergrößerung im Lichtmikroskop angeschaut und für jedes Blickfeld die Gefäßzahl erfasst. Die HT29-luc-Tumore wiesen verglichen mit den HCT116-luc-Tumoren eine höhere Gefäßanzahl im Tumor auf. Bei der Zelllinie HT29-luc war ein geringer, nicht signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen zu identifizieren. Die mittlere Gefäßanzahl in den mit CG34 behandelten Tumoren lag etwas höher als die Gefäßanzahl in den nicht behandelten Tumoren. Bei den HCT116-luc-Tumoren war allerdings kein Unterschied bezüglich der Gefäßzahl und der sich darin ausdrückenden Vaskularisierung zwischen den beiden Gruppen festzustellen.

Die **Abbildung 21** spiegelt ihrerseits die Ergebnisse der Ki67-Bestimmung für beide Tumorentitäten wider. Es wurden genauso wie bei der oben beschriebenen Gefäßquantifizierung 3 bis 4 mit der 20-fachen Objektivvergrößerung aufgenommen Blickfelder zur Auswertung herangezogen. Es wurden die mit dem Ki67-Antikörper rot angefärbten, mitotisch aktiven Tumorzellen sowie die nicht angefärbten, sich nicht teilenden Tumorzellen in jedem Blickfeld mit Hilfe des Programms Image J gezählt und daraus wurde Ki67 in Prozent für jedes Blickfeld errechnet. Es fiel auf, dass die HCT116-luc-Tumorzellen einen ungefähr 2,5-fach höheren Ki67-Anteil hatten als die daneben abgebildeten HT29-luc-Zellen. Außerdem war der Ki67-Mittelwert für die CG34-Behandlungsgruppe bei HCT116-luc signifikant erhöht im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollgruppe. In den Tumoren, denen das Chemerin-9-Analogon täglich

zugegeben wurde, waren dementsprechend mehr proliferierende Tumorzellen enthalten als in den Tumoren der Mäuse, die Wasser (Vehikel) injiziert bekamen. Für die Tumore der Zelllinie HT29-luc war auch eine Differenz der mittleren Ki67-Rate zu Gunsten der Behandlungsgruppe nachweisbar, diese war aber kleiner als bei der Zelllinie HCT116-luc und besaß keine statistische Signifikanz. Die Tumore der Behandlungsgruppe zeichneten sich also durch eine etwas höhere Proliferationsfraktion als die nicht behandelte Vergleichsgruppe aus.

Alles in allem kann man konstatieren, dass der am Ende der Arbeit durchgeführte Behandlungsversuch mit der stabilen Chemerin-9-Variante CG34 den Nachweis für die die Tumorproliferation *in vivo* stimulierende Wirkung von CG34 erbrachte. Die in die Behandlungsgruppe eingeschlossenen Tiere zeigten im Vergleich zu den Tieren aus der Kontrollgruppe, gemessen anhand zweier Detektionsmethoden der Größenmessung und Biolumineszenz-Bildgebung eine seit dem Behandlungsbeginn zunehmende Erhöhung der Tumorgroße sowie ein größeres Tumolvolumen und –gewicht am Versuchsendpunkt, und zwar für beide untersuchten Tumorzelllinien. Im Anschluss wurde der Ursache für den beobachteten Wachstumseffekt nachgegangen und eine histologische Beurteilung der den Tieren aus beiden Versuchsgruppen entnommenen Tumore vorgenommen, mit dem Ziel die Ki67-Rate, Tumornekrose sowie -vaskularisierung zu charakterisieren und die beiden Gruppen anhand dieser Parameter zu vergleichen. So wurde in den HCT116-luc-Tumoren der Behandlungsgruppe eine signifikant erhöhte Ki67-Proliferationsrate verglichen mit der Kontrollgruppe quantifiziert. Dagegen ergab sich für die mit CG34 behandelten HT29-luc-Tumore eine höhere Gefäßzahl als für die Kontrolltumore.

5. Diskussion

5.1 Der positive Einfluss von Stresshormonen und Peptiden auf das kolorektale Tumorwachstum *in vitro*

5.1.1 Proliferative Wirkung von Stresshormonen auf die kolorektalen Tumorzellen

Am Beginn der Doktorarbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Stresshormone, unter anderem Cortisol und Noradrenalin als Hauptvertreter, in der Lage seien die Proliferation der drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien *in vitro* voranzutreiben. Es wurde eine direkte Wirkung von Cortisol und Noradrenalin auf das Proliferationsverhalten und die Fähigkeit zur Koloniebildung der Tumorzellen postuliert, die wir mithilfe des etablierten DAPI-Proliferationsassays und des HTCA zu erfassen suchten.

Die indirekte Wirkung von Cortisol auf das Tumorwachstum ist durch die durch Cortisol initiierte Immunsuppression bedingt und schon lange bekannt. Wir nahmen aber an, dass Cortisol bzw. sein hochpotentes Analogon Dexamethason direkt durch die Bindung an seinen im Zellzytoplasma lokalisierten Glukokortikoidrezeptor die Proliferationsrate der kolorektalen neoplastischen Zellen verändern könnten, indem der aktivierte Cortisol-Glukokortikoidrezeptor-Komplex in den Zellkern transloziert würde und an die spezielle Hormone responsive Elements der DNA andocken und darüber die Transkription der für Tumorproliferation und Progression zuständigen Gene verstärken würde. Dazu wurde der direkte Effekt der Behandlung mit dem Glukokortikoidrezeptor-Agonisten Dexamethason auf die kolorektalen Tumorzellen unter den *in-vitro*-Bedingungen beobachtet, wobei der indirekte Einfluss von Dexamethason auf das Immunsystem so eliminiert werden konnte. Die Ergebnisse unseres DAPI-Proliferationsassays sprachen für die positive Wirkung von Dexamethason auf das Tumorwachstum *in vitro*. Alle drei getesteten Adenokarzinomzelllinien zeichneten sich durch einen signifikanten Anstieg der Zellzahl unter Dexamethason verglichen mit der Negativkontrolle aus. Dexamethason besaß dabei den höchsten proliferativen Effekt auf die HT29-luc-Zellen. Im HTCA gelang uns der Beweis des stimulierenden Einflusses von Dexamethason auf die Koloniebildung der Zellen ebenfalls aller drei kolorektaler Adenokarzinomzelllinien. Der höchste Koloniezuwachs unter der Dexamethason-Behandlung konnte bei den HCT116-luc und HT29-luc nachgewiesen werden. Entsprechend den mit den beiden Untersuchungsmethoden generierten Daten kann man behaupten, dass das Cortisol-Analogon Dexamethason sich essentiell positiv auf *in-vitro*-Tumorzelleigenschaften des kolorektalen Karzinoms wie die Tumorproliferation und

Koloniebildung auswirkte und auf diese Weise einen direkten nicht an das Immunsystem gebundenen Beitrag zur Tumorinduktion bzw. –progression leistete.

In der Arbeit von Berrada et al. wurde aber ein zu unseren Beobachtungen gegenteiliger antiproliferativer Effekt von Dexamethason publiziert. Berrada und seine Mitarbeiter erforschten die Wirkung von Dexamethason auf zwei Ratten-Kolonkarzinomzelllinien PROb und REGb (87). Die beiden Zelllinien trugen Glukokortikoidrezeptoren und unterschieden sich in ihrer Tumorigenität: die REGb-Zellen stammen aus regressiven Tumoren und die PROb-Zelllinie erzeugte progressive Tumore, die in die Lunge, Niere und Lymphknoten metastasierten. Nach der Dexamethasongabe verlangsamten beide Zelllinien ihr Wachstum, was sich in der verminderten [3H]-Thymidine-Inkorporation widerspiegelte. Der inhibitorische Effekt von Dexamethason auf das Tumorzellwachstum war in den regressiven REGb-Zellen stärker ausgeprägt als in den progressiven, weniger differenzierten PROb-Zellen, obwohl die PROb-Zellen mehr Glukokortikoidrezeptoren mit einer höheren Anzahl von spezifischen Bindungsstellen für die Glukokortikoide in ihrem Zytoplasma als die REGb-Zellen enthielten. Wenn man davon ausgeht, dass der antiproliferative Effekt von Dexamethason über die Glukokortikoidrezeptoren vermittelt wird, würde man jedoch eher eine genau umgekehrte Konstellation erwarten, nämlich dass bei den progressiven PROb-Zellen, die über eine höhere Zahl an Glukokortikoidrezeptoren verfügten, die Zellproliferation stärker gehemmt wird als bei den regressiven REGb-Zellen mit weniger Glukokortikoidrezeptoren im Zellinneren. Eine später erschienene Publikation von Meyer et al. versucht den Sachverhalt aufzuklären. Meyer fand heraus, dass bei der PROb-Zelllinie nach der Behandlung mit einem Glukokortikoidrezeptor-Agonisten RU 28362 es zu einer Blockade der Transkription der Gene für die intrazellulären Glukokortikoidrezeptoren kam. Der Glukokortikoidrezeptor-Antagonist RU 38486 machte die Transkriptionsblockade wieder reversibel (88). Die Ergebnisse von Berrada könnten nach dieser Erkenntnis so interpretiert werden, dass die PROb-Zellen nach dem ersten Kontakt mit Dexamethason die RNA-Synthese für die Glukokortikoidrezeptoren herunterregulierten, im Verlauf weniger Glukokortikoidrezeptoren exprimierten und dadurch die weitere Glukokortikoidbehandlung mit einer geringeren inhibitorischen Wirkung auf die Zellproliferation als die REGb-Zellen beantworteten. Bei der Interpretation der von Berrada vorgelegten Ergebnissen muss auch berücksichtigt werden, dass es sich um Tumorzelllinien handelte, die aus Ratten isoliert wurden, die an chemisch induzierten kolorektalen Adenokarzinomen erkrankten. Unsere Resultate, die von einer proliferativen Wirkung von Dexamethason zeugen, stammen von kolorektalen Adenokarzinomzelllinien humanen Ursprungs mit ebenfalls unterschiedlichen Differenzierungsgraden. Es wäre zu bedenken, dass die Ratten-

Tumorzelllinien aus künstlich erzeugten Kolonkarzinomen andere Tumorcharakteristika und Rezeptorverteilungsmuster als die humanen Tumorzelllinien aus sporadisch entstandenen kolorektalen Adenokarzinomen besitzen und dementsprechend auch anders auf die Behandlung mit Dexamethason reagieren könnten. Zusätzlich wurde der die Tumorproliferation *in vitro* hemmende Effekt von Dexamethason bei viel höheren Konzentrationen von 1 μM nach 12 Stunden demonstriert. Wir verwendeten dagegen viel niedrigere Dexamethasonkonzentrationen von maximal 200 nM für unsere Experimente und konnten erst nach 4 Tagen nach dem Behandlungsbeginn einen positiven proliferativen Effekt vermerken. Vermutlich ist die Konzentration von Dexamethason bzw. die Behandlungsdauer für die Wirkung auf die Zellen entscheidend. Man könnte spekulieren, dass Dexamethason das Tumorwachstum bei höheren Konzentrationen und kürzerer Behandlungsdauer zu hemmen und bei niedrigeren Konzentrationen und längerer Behandlungs- bzw. Beobachtungszeit zu fördern vermag.

Eine andere mögliche Erklärung für unsere Daten stützt sich auf den im Jahr 2011 erschienenen Artikel von Sidler et al., in welchem eine extraadrenale Produktion von Cortisol in den kolorektalen Tumorzellen beschrieben wurde (89). Zwei kolorektale Adenokarzinomzelllinien, Caco2 und HT29, sowie das primäre humane Tumorgewebe von Dickdarmkrebspatienten exprimierten die für die Steroidogenese notwendigen Enzyme und sezernierten signifikante Mengen an bioaktivem Cortisol. Die Cortisolsynthese unterlag der Steuerung durch den Transkriptionsfaktor, Liver Rezeptor Homolog-1 (LRH-1). Die Cortisolfreisetzung durch die kolorektalen Tumorzellen erfüllte eine immunsuppressive Funktion, indem die Anzahl der T-Lymphozyten nach der Exposition mit dem Cortisol beinhaltenden Überstand der Tumorzellen reduziert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass gerade bei der kolorektalen HT29-Zelllinie, die laut der Publikation von Sidler et al. relevante Menge an Cortisol *de novo* synthetisierte, die Zellzahländerung sowie die Koloniezahlnahme am höchsten lagen. Man kann hypothetisieren, dass Dexamethasongabe über die über den Glukokortikoidrezeptor vermittelte Signaltransduktion eine autokrine Sekretion von Cortisol induzierte. Das initial exogen zugesetzte Cortisol-Analogon könnte die endogene zusätzliche Cortisolfreisetzung aus den Zellen stimulieren, woraufhin sich die Cortisol-/Dexamethasongesamtmenge vermehrte und die Cortisolwirkung sich potenzierte und sich so in einem hohen signifikanten proliferativen bzw. die Koloniebildung verstärkenden Effekt niederschlug. Daher wäre es wichtig als Nächstes die endogene Cortisolsekretion in den Überständen der von uns untersuchten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien nach der Dexamethasonbehandlung zu bestimmen, um die angenommene, der höheren Proliferationsrate zugrunde liegende autokrine Sekretion der Tumorzellen zu überprüfen. In den weiterführenden Schritten sollte ebenso die endogene

Glukokortikoidrezeptorexpression in den drei kolorektalen Tumorzelllinien in der RT-PCR bzw. mittels monoklonaler Antikörper in der Immunfluoreszenz untersucht werden, um die Korrelation zwischen der Glukokortikoidrezeptormenge und der höheren Proliferationsrate anzuschauen. Da in einigen Studien das Vorhandensein von Glukokortikoidrezeptoren im malignen kolorektalen Gewebe im Vergleich zur gesunden Kolonmukosa sowie eine Assoziation zwischen dem positiven Nachweis für die Glukokortikoidrezeptoren und dem Tumorgrad berichtet wurde (34-36).

Parallel würden wir uns in den folgenden Studien der Rolle von Cortisol für das Tumorstadium *in vivo* widmen. Einige bereits durchgeführte *in-vivo*-Studien tendierten dazu Cortisol als einen antiproliferativen Faktor anzusehen. Dexamethason inhibierte das *in-vivo*-Zellwachstum einer Maus-Kolonkarzinomzelllinie CO-38 und zweier humaner kolorektaler Tumorzelllinien LoVo und H81-4 im Xenograft-Mausmodell (90). Dagegen berichteten Tutton et al. von einer Verzögerung der Proliferation durch eine Adrenalectomie in den durch ein Kanzerogen Dimethylhydrazin (DMH) induzierten kolorektalen Rattenadenokarzinomen (91). Die Behandlung der adrenalectomierten Ratten mit Hydrocortison machte den beobachteten Effekt wieder rückgängig. Bei der erkennbar widersprüchlichen Datenlage wäre es erforderlich die drei humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien, die einen aktivierenden Effekt auf die Tumorstadium in unseren *in-vitro*-Studien hatten, der Untersuchung des *in-vivo*-Wachstums im Xenograft-Nacktmausmodell zu unterziehen.

Bezüglich des zweiten untersuchten Stresshormons Noradrenalin wurde eine statistisch signifikante Erhöhung des Tumorstadium in den HT29-luc- und SW620-luc-Zellen infolge 4-tägiger Behandlung mit Noradrenalin gesehen. Noradrenalin verstärkte die Koloniebildung nur in den HT29-luc-Zellen. Dazu sollte erwähnt werden, dass in vorhergehenden Studien die Expression von Adrenorezeptoren der $\alpha 2$ -Subklasse in den HT29-Zellen mithilfe von Bindungsstudien sowie mit dem Northern blot auf der mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte (92, 93). Außerdem löste die Zugabe von Noradrenalin zu den HT29-Tumorzellen eine signifikante Zunahme der extrazellulären Acidifikationsrate (ECAR) aus, die mit einem erhöhten Protonenfluss in den Extrazellulärraum einherging (94). Die Erhöhung der ECAR war mit dem Anstieg der metabolischen Zellaktivität gleichzusetzen und wurde durch die Aktivierung der funktionellen Noradrenalinrezeptoren vermittelt. Auf der Basis der Erkenntnisse könnte man behaupten, dass die stimulierende Auswirkung der Noradrenalinzugabe insbesondere auf die HT29-luc-Zelllinie in Bezug auf die beiden Tumoreigenschaften wie die Proliferation *in vitro* sowie die Fähigkeit zur Koloniebildung daher

rührt, dass die HT29-luc-Zellen die α 2-Rezeptoren überexprimieren und deswegen effektiver als die Zellen anderer untersuchter kolorektaler Zelllinien auf Noradrenalin ansprechen. Die Annahme, dass eine Überexpression von Noradrenalinrezeptoren auf den kolorektalen Tumorzellen für die Vermittlung von anderen Effekten neben dem Tumorproliferationseffekt im Rahmen des malignen Transformationsprozesses sorgt, bekräftigt die Publikation von Masur et al.. Diese geht auf die durch Noradrenalinapplikation hervorgerufene Migration der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie SW480 ein (95). Die die Noradrenalinrezeptoren der β -Subklasse in hohem Maße exprimierenden SW480-Zellen konnten ihre lokomotorische Aktivität von 25 % auf 65 % dank der Zugabe von Noradrenalin steigern. Durch den Zusatz des β 1/2-Rezeptorblockers Propranolol wurde die dem Noradrenalin geschuldete Migration unterbrochen. An der Signalkaskade zur Vermittlung der durch Noradrenalin induzierten Migration waren offenbar die Proteintyrosinkinase der Src-Familie, die Phospholipase C und die Proteinkinase C beteiligt. Im Folgenden sollte der Nachweis und eine genaue Klassifizierung der α 2- bzw. β -Rezeptoren auf den im DAPI-Proliferationsassay sowie im HTCA positiven kolorektalen Tumorzellen sowie ein Versuch der Inhibition der detektierten Wirkungen von Noradrenalin durch einen α 2- oder β -Rezeptorantagonisten erfolgen, was uns bei der Klärung der für die festgestellten Effekte verantwortlichen Mechanismen weiterhelfen könnte.

5.1.2 Proliferative Wirkung von gastrointestinalen Peptiden auf die kolorektalen Tumorzellen

Unsere anfängliche Fragestellung widmete sich nicht nur dem Einfluss von Stresshormonen, sondern auch von Peptiden auf die Proliferation von kolorektalen Tumorzellen. In dem Rahmen des bereits angesprochenen Screeningverfahrens wurden insgesamt drei unterschiedliche gastrointestinale Peptidhormone, Neurotensin, Glucagon-like Peptid 2 (GLP-2) und Somatostatin mit zwei voneinander unabhängigen Assays, dem DAPI-Proliferationsassay und dem Human Tumor Colony Forming Assay, untersucht.

Das aus den N-Zellen des Dünndarmes sezernierte Peptidhormon Neurotensin zeigte in dem von uns etablierten DAPI-Proliferationsassay einen signifikanten Effekt auf das Tumorwachstum von zwei von insgesamt drei untersuchten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien, HCT116-luc und HT29-luc, in drei unabhängigen Versuchen. Die Behandlung mit Neurotensin der Tumorzellen der Zelllinie SW620-luc generierte ebenfalls eine im Vergleich zur nicht behandelten Negativkontrolle erhöhte Zellzahl. Die Tumorzellzahlerhöhung war allerdings klein und nicht statistisch signifikant. Die von uns beobachtete, die Tumorproliferation *in vitro* verstärkende

Wirkung von Neurotensin wurde bereits in den vorhergehenden Arbeiten von anderen Forschungsgruppen beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Maoret konnte nach einer 10-tägigen Behandlung der Zellen der fünf kolorektalen Tumorzelllinien, unter anderem der auch von uns getesteten Zelllinien (SW620, HT29 und HCT116), einen signifikanten Anstieg der Zellzahl im Vergleich zur Negativkontrolle feststellen (96). Bei allen fünf Zelllinien wurde die endogene Expression des Neurotensinrezeptors NTSR1 auf der mRNA-Ebene in der RT-PCR nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ließen sich in der Tumorzelllinie Caco2 keine NTSR1-mRNA-Expression und auch keine Reaktion auf die Neurotensin-Behandlung im Sinne einer stimulierten Zellproliferation detektieren. Diese Beobachtungen wiesen darauf hin, dass der die Tumorpheriferation *in vitro* stimulierende Effekt von Neurotensin offenbar direkt über den Neurotensinrezeptor, NTSR1, vermittelt wird.

Im HTCA konnten wir eine stimulierende Wirkung von Neurotensin auf die Tumorkoloniebildung für zwei von drei Zelllinien zeigen. Dabei waren es dieselben Tumorzelllinien, nämlich HCT116-luc und HT29-luc, die auch schon im DAPI-Proliferationsassay mit einer Proliferationssteigerung auf die Inkubation mit Neurotensin reagierten. Es ist zu vermuten, dass die beiden kolorektalen Tumorzelllinien über eine erhöhte Expression von Neurotensinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche verfügten, die infolge der Neurotensingabe aktiviert wurden und die beiden für die Tumorbiologie des kolorektalen Karzinoms wichtigen Prozesse, wie Tumorzellproliferation und Koloniebildung, induzierten. Die Arbeitsgruppe von Maoret beschäftigte sich ebenfalls mit der Frage nach der Rolle von Neurotensin für die Koloniebildung (96). Dazu wurden die NSTR1 exprimierenden kolorektalen SW480-Zellen auf den soft agar gesetzt und mit Neurotensin behandelt. Am Ende konnte eine Steigerung der Koloniezahl um 50 % verglichen mit der Negativkontrolle erzielt werden. Die Kombination von Neurotensin mit dem Neurotensinrezeptor-Antagonisten SR 48692 konnte die Koloniebildung stimulierende Wirkung von Neurotensin allerdings aufheben, was für eine an den Neurotensinrezeptor gebundene Transduktion des die Koloniebildung fördernden Effektes sprach.

In unserer Arbeit verzichteten wir bewusst auf die weiterführende Untersuchung des Neurotensineinflusses auf das Proliferationsverhalten *in vivo* der humanen kolorektalen Tumorzellen, da dieser bereits in mehreren Arbeiten publiziert wurde. So berichtete die Forschungsgruppe von Yoshinaga über den Anstieg der mittleren Tumorfläche, des Tumorgewichtes sowie des DNA-, RNA- und Proteingehaltes in den MC-26- und LoVo-Tumoren der mit Neurotensin (300 bzw. 600 ug/kg) behandelten Nacktmäuse (97). Maoret gab ebenfalls eine durch Neurotensin ausgelöste Verstärkung des Tumorwachstums *in vivo* bei den

SW480-Tumore tragenden Mäusen an (93). Die Tierexperimente untermauerten die Rolle von Neurotensin als eines wirksamen trophischen Faktors für das kolorektale Tumorwachstum *in vivo*. Andererseits legten sie die Idee der Inhibition der Neurotensinwirkung als eine denkbare Therapieoption für das kolorektale Karzinom nah. Die Hemmung der Neurotensinrezeptoren mit den entsprechenden Rezeptorantagonisten in Anlehnung an den *in-vivo*-Versuch von Maoret könnte als ein möglicher Angriffspunkt angesehen werden. Dabei demonstrierten zahlreiche Studien das Vorhandensein von Neurotensinrezeptoren, vor allem des NSTR1, auf humanen Adenokarzinomzelllinien, die aus den Resektaten der am Kolonkarzinom erkrankten Patienten gewonnen wurden (98). Der positive Nachweis einer NSTR1-Überexpression in den Biopsaten aus einer auf Malignität verdächtigen Kolonläsion wäre mit einem erhöhten Ansprechen auf die NSTR1-Antagonisten vergesellschaftet und könnte der Selektion der Patienten für den Therapieansatz dienen.

In den letzten Jahren wurde das Augenmerk auf die Mechanismen für die Vermittlung des proliferativen Neurotensineffektes gelegt. Neurotensin bindet wie viele andere Neuropeptide an die sieben Transmembrandomäne des G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR) und induziert darüber unterschiedliche Signalwege (54). Ehlers konnte eine verstärkte Kalzium-Mobilisation aus dem endoplasmatischen Retikulum nach der Behandlung mit Neurotensin der NSTR1 exprimierenden kolorektalen Tumorzellen der Zelllinie KM20 beobachten (99). Der Kalzium-Influx konnte durch den hochaffinen NSTR1-Antagonisten, SR48692, blockiert werden. Neurotensin förderte zusätzlich die Kalzium-Mobilisation in den HT29-Zellen (100). Die Neurotensingabe wurde von den KM20-Zellen auch mit der Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges beantworteten, indem im Western Blot eine erhöhte Menge an phosphorylierten und somit aktivierten ERK 1 und ERK 2 detektiert wurde. Bei den HT29-Zellen war Neurotensin in der Lage durch die Bindung an einen spezifischen GPCR die Phospholipase C zu aktivieren, welche ihrerseits die Synthese von Inositol Phosphat-3 (IP3) mit nachfolgender Kalzium-Mobilisation auslöste (101). Eine Erhöhung des zytoplasmatischen Kalzium-Spiegels führte wahrscheinlich zur Induktion der Kalzium-abhängigen Proteinkinasen, die letzten Endes die ERK 1/2 stimulierten. Auf der Grundlage dieser Daten wäre die in unserer Screeninguntersuchung dokumentierte proliferative sowie die Koloniebildung verstärkende Wirkung von Neurotensin auf die HT29-luc- und HCT116-luc-Zellen am ehesten auf den vermehrten intrazellulären Kalziumfluss zurückzuführen und könnte mit einer nachfolgenden Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges einhergehen. Denn der MAP-Kinase-Signalweg mündet bekanntermaßen in die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren für die Gene, die das Tumorzellwachstum und die Tumormetastasierung regulieren. Zur Prüfung der aufgestellten

Annahme wären allerdings die Messung der intrazellulären Kalzium- bzw. IP3-Spiegel als führenden second messengers sowie eine Western blot-Analyse der ERK 1/2 bzw. *in-vitro*-Kinase-Assay in den HT29-luc- und HCT116-luc-Zellen nach einer Neurentensinbehandlung notwendig.

Ein weiteres ebenfalls im Dünndarm vorkommendes Peptid GLP-2 besaß eine die Proliferation *in vitro* fördernde Wirkung auf zwei kolorektale Tumorzelllinien, HT29-luc und HCT116-luc, in dem DAPI-Proliferationsassay. Bei der Zelllinie SW620-luc konnte ebenfalls eine Erhöhung der Zellzahl infolge der GLP-2-Gabe im DAPI-Proliferationsassay dokumentiert werden, die allerdings nicht statistisch signifikant ausfiel. Der von uns gesehene proliferative Effekt von GLP-2 auf die kolorektalen Tumorzellen kann durch die in der Arbeit von Masur et al. präsentierten Ergebnissen bestätigt werden (102). Die Verdopplungszeit der mit GLP-2 10 Tage lang behandelten SW480- und HT29-Zellen verkürzte sich nämlich entsprechend der Dosis-Wirkungsbeziehung mit der steigenden GLP-2-Konzentration. Nach der kombinierten Gabe von GLP-2 zusammen mit dem Inhibitor der GLP-2 spaltenden Dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV) konnte die Verdopplungszeit noch stärker als durch die alleinige GLP-2-Behandlung reduziert werden. Dieses Phänomen könnte durch die Verlängerung der Wirkungszeit von GLP-2 durch die Hemmung des das GLP-2 inaktivierenden Enzyms erklärt werden. Die Daten von der Forschungsgruppe um Koehler widersprechen aber den aus der Arbeit von Masur sowie aus unserer Doktorarbeit gewonnenen Erkenntnissen. Koehler setzte die drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien (DLD1, SW480 und HT29), die den GLP-2-Rezeptor überexprimierten, einer 4-tägigen Behandlung mit GLP-2 aus (103). GLP-2 nahm im MTS-Assay keinen Einfluss auf das Tumorstadium der Zellen. Es sollte beachtet werden, dass die Studie von Koehler einige Einschränkungen aufwies, die den negativen Nachweis einer Tumorstadiumswirkung von GLP-2 zur Folge haben könnten. Die Arbeitsgruppe von Koehler benutzte für ihren Proliferationsassay das GLP-2, das als ein Peptid eine sehr kurze Halbwertszeit von lediglich einigen Stunden besaß. Der Mediumwechsel mit der erneuten Zugabe von GLP-2 erfolgte allerdings alle 24 h, sodass es denkbar wäre, dass das instabile GLP-2 nur sehr kurze Zeit wirken und demzufolge nicht seine volle Wirkung entfalten konnte bzw. die aufgebaute Wirkung nicht sehr lange anhielt und mit der erneuten GLP-2-Gabe erst nach 24 h nicht potenziert werden konnte. In unseren Proliferationsversuchen versuchten wir die oben aufgeführten angenommenen Effekte zu vermeiden und verwendeten deshalb die stabile Gly2-GLP-2-Variante. Das lang wirksame Gly2-GLP-2 erlaubte uns somit den proliferativen Effekt von GLP-2 unter den mit dem Versuchsaufbau von Koehler et al. übereinstimmenden

Versuchsbedingungen wie dem Mediumwechsel alle 24 h und der Behandlungsdauer von 4 Tagen nachzuweisen. Masur verwendete analog zu Koehler das native GLP-2. Der Wachstumseffekt von GLP-2 konnte aber wahrscheinlich durch eine längere Behandlungsdauer mit dem GLP-2 erzielt werden, da sich die kurze GLP-2-Wirkung nach langer Zeit aufsummieren könnte. Außerdem war die Verdopplungszeit erst nach der Gabe des DPPIV-Inhibitors zum GLP-2 bei maximaler GLP-2-Konzentration von 10 nmol/l signifikant erniedrigt, darauf hinweisend, dass erst unter Verlängerung der GLP-2-Einwirkungszeit mittels der Hemmung des schnellen GLP-2-Abbaus ein signifikanter deutlicher Proliferationseffekt beobachtet werden konnte. Die Forschungsgruppe von Koehler beschrieb außerdem den durch GLP-2-Applikation verursachten intrazellulären cAMP-Anstieg und die Aktivierung der Tumorwachstumssignalwege mit dem Anstieg der phosphorylierten und somit aktivierten ERK1/2-Enzyme in den mit dem GLP-2-Rezeptor stabil transfizierten kolorektalen Karzinomzelllinien, ohne dass es zur Modulation der Proliferationsrate der Tumorzellen durch das GLP-2 kam (103). Dieses Ergebnis untermauerte unsere vorher aufgestellte Annahme, dass das kurz wirksame GLP-2 einen Effekt auf die Tumorzellen haben könnte, welcher scheinbar durch die Einleitung der MAP-Kinase-Signalkaskade mit der Aktivierung der zweiten Botenstoffen vermittelt würde, aber nicht lange anhielt und sich deswegen nicht in dem sichtbaren signifikanten Wachstumseffekt *in vitro* niederschlug. Nichtsdestotrotz sollte erwähnt werden, dass Koehler und seine Mitarbeiter das Fehlen der GLP-2-Rezeptorexpression in den Wildtypen der untersuchten kolorektalen Zelllinien (DLD1, HT29, SW480) in der RT-PCR nachweisen konnten (103). Es wäre somit durchaus denkbar, dass die GLP-2-Wirkung indirekt, also nicht über einen GLP-2-Rezeptor in das Zellinnere weitergeleitet wurde. Andererseits ist es auch möglich, dass es unterschiedliche Rezeptoren für das GLP-2 existierten und die Tumorzellen mit dem „falschen“ GLP-2-Rezeptor transfiziert wurden, der gar nicht in der Lage war das Signal für das Tumorwachstum und –metastasierung in den Zellkern zu translozieren.

Im HTCA löste die Behandlung der Zellen aller drei kolorektaler Adenokarzinomzelllinien mit GLP-2 keine Änderung der Koloniezahl im Vergleich zur Negativkontrolle aus. Trotz des nachgewiesenen proliferativen Effektes von GLP-2 im DAPI-Proliferationsassay konnte kein Einfluss auf die Koloniebildung der Tumorzellen detektiert werden. Es hängt damit zusammen, dass der HTCA als Assay die Bildung einer dreidimensionalen Ansammlung der Tumorzellen zu einer Kolonie misst und die Tumorigenizität *in vitro* und nicht direkt das Tumorwachstum in dem Sinne erfasst. Hinter der Stimulation der Koloniebildung verbirgt sich eine andere Tumoreigenschaft, nämlich die Fähigkeit mit anderen Tumorzellen am ehesten durch Sekretion von Botenstoffen in Kontakt zu treten, sich zu teilen und dadurch eine Kolonie zu formieren,

was mit einem ausgeprägten Metastasierungsverhalten in Einklang zu bringen wäre. Eine vermehrte Koloniebildung infolge einer Substanzgabe würde für das durch die Substanz verliehene erhöhte Metastasierungspotenzial der Zellen sprechen. Möglicherweise verfügt das GLP-2 nicht über ein Koloniebildung und damit Tumormetastasierung förderndes Potenzial. Der aktivierende Effekt auf die Kloniebildung geht in der Regel aus den oben erläuterten Gründen mit einem positiven Einfluss auf das Tumorstadium *in vivo* einher. Da die GLP-2-Behandlung nicht in einer stimulierten Koloniebildung resultierte, beschlossen wir keine Tierversuche zur Verifizierung des *in-vivo*-Effektes von GLP-2 auf das Tumorstadium anzuschließen. Zu der Rolle von GLP-2 bei der Proliferation und Metastasierung des kolorektalen Karzinoms *in vivo* liegen im Moment die sich zu einander kontrovers verhaltenden Daten vor. Die Befunde aus den Experimenten mit den durch unterschiedliche kanzerogene Substanzen induzierten Kolonkarzinommodellen unterstrichen den positiven Effekt des GLP-2 und seiner lang wirksamen Analoga auf die Kanzerogenese *in vivo*. In einem 1,2-Dimethylhydrazin (DMH)-Mausmodell konnte eine Zunahme der Anzahl der kleinen, mittleren und großen Neoplasmen nach der Gabe der stabilen GLP-2-Variante Gly2-GLP-2 registriert werden (104). Die Mäuse, bei denen das sporadische kolorektale Karzinom mithilfe von Azoxymethane erzeugt wurde, entwickelten mehr aberranten Krypten sowie neue Kryptendysplasien nach der Gly2-GLP-2-Applikation (105). Diesen Resultaten stehen die *in-vivo*-Daten von der Forschungsgruppe um Koehler gegenüber (103). Bei den mit dem GLP-2-Rezeptor transfizierten DLD1- und SW480-Tumoren wurde keine Modifikation des Tumorgewichtes und der Tumorstadium infolge der GLP-2-Behandlung nachgewiesen. Im APC-Mutation-Mausmodell trug die GLP-2-Zugabe nicht zum Anstieg der Polypenzahl bzw. der Polypengröße bei (103, 62). Die Ratten, die am Kolonkarzinom litten und total parenteral ernährt wurden, demonstrierten ebenfalls keine Tumorstadiumveränderung nach der GLP-2-Behandlung (61). Es fiel auf, dass auch in diesen *in-vivo*-Versuchen die Behandlung der Tiere mit der stabile GLP-2-Variante Gly2-GLP-2 einen positiven Wachstumseffekt nach sich zog, bei der Verwendung des nativen kurz wirksamen GLP-2 bestand jedoch keine stimulierende Wirkung auf das Tumorstadium. Koehler et al. arbeiteten mit dem kurz wirksamen GLP-2, das GLP-2 wurde in viel geringeren Mengen (5 µg) als zum Beispiel beim DMH-Mausmodell (25 µg) appliziert, was für den mangelnden Nachweis eines Wachstumseffektes von GLP-2 verantwortlich sein könnte. Es ist ersichtlich, dass GLP-2 sich ausschließlich in den durch Kanzerogene induzierten Kolonkarzinommodellen als ein trophischer Faktor manifestierte. Die Relevanz der kolorektalen Tumormodelle sowie des APC-Mutation-Tumormodells für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms blieb aber fraglich, denn diese Modelle führten schließlich zur Entstehung von Polypen als präkanzerösen Läsionen,

es konnten jedoch keine Karzinome gesehen werden. Es bleibt unklar, ob die Zunahme der polypösen Läsionen nicht eher der unterschiedlich starke Wirkung von Kanzerogenen als dem GLP-2 zuzuschreiben war.

Zusammenfassend scheint das stabile, lang wirksame Gly2-GLP-2 einen Wachstumsfaktor für das kolorektale Karzinom darzustellen. Aus dem Grund vermuten wir, dass eine langjährige Einnahme und Therapie mit den DPPIV-Inhibitoren, die unter anderem bei Diabetes Typ II oder Kurzdarmsyndrom indiziert ist, das Risiko einer Akkumulation des potenten GLP-2 infolge verlängerter Halbwertszeit und damit die Gefahr der Entwicklung bzw. Progression eines kolorektalen Karzinoms in sich bergen. Jedoch sollte man nicht vergessen, dass die endgültige Rolle des GLP-2 und seiner stabilen Analoga für die Tumorinduktion bzw. -progression des kolorektalen Karzinoms sowie die hinter der in einigen Studien nachgewiesenen tumorproliferativen Wirkung stehenden Signaltransduktionswege noch unzureichend erforscht sind und weiterer Studien benötigen.

Somatostatin greift in die Funktionen vieler unterschiedlicher Organsysteme ein und kann als ein universeller endokriner „Ausschalter“ bezeichnet werden, da es die Produktion und Sekretion von Wachstumshormonen sowie von zahlreichen gastrointestinalen Hormonen hemmt. Zusätzlich ist das Somatostatin für seine inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum bekannt. Im Rahmen unseres Substanzscreenings wurde ebenfalls das Proliferationsverhalten der kolorektalen Tumorzellen unter der Behandlung mit einem langwirksamen Somatostatin-Analogen SOM230 untersucht. Im Proliferationsassay wurde eine geringe nicht statistisch signifikante Abnahme der Zellzahl bei den Tumorzelllinien HCT116-luc und HT29-luc unter SOM230 konstatiert. Bei der Zelllinie SW620-luc bestand überraschenderweise eher eine dezente, ebenfalls nicht statistisch signifikante Zunahme der Zellzahl. Im HTCA ergaben sich auch keine signifikanten Änderungen der Koloniezahl nach der SOM230-Einwirkung für die HT29-luc und SW620-luc-Zellen. Die HCT116-luc-Zelllinie wurde nicht im HTCA untersucht. Die fehlende inhibitorische Wirkung des Somatostatin-Analogen SOM230 auf das Tumorzellwachstum der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie SW620 ist mit den Resultaten aus der Arbeit von Di Paolo et al. in Einklang zu bringen. Die Forschungsgruppe um Di Paolo arbeitete mit einer anderen langwirksamen Somatostatin-Variante, nämlich SMS 201-995, die ebenfalls das Wachstums der SW620-Zellen nicht zu hemmen vermochte, sondern sogar etwas anhub (106). Im Gegenteil dazu inhibierte das SMS 201-955 die Proliferation der SW480-Zellen. Nach der SMS 201-995-Gabe sank die durch eine vorhergehende EGF-Behandlung induzierte [3H]-Thymidin-Aufnahme in die SW480-Zellen. Da Somatostatin dazu befähigt ist die

Freisetzung und Wirkung von Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF-1 bzw. TGF-alpha zu hemmen (107), könnte das Somatostatin-Analogon SMS 201-995 durchaus dem mitogenen Effekt vom EGF auf die SW480-Tumorzellen entgegen gewirkt haben. Am ehesten geschah es durch die über den Somatostatinrezeptor vermittelte Phosphorylierung und damit Inaktivierung des Wachstumsfaktors. Ein anderer für den inhibitorischen Einfluss von Somatostatin verantwortlicher Mechanismus wurde ebenfalls in den kolorektalen SW480-Adenokarzinomzellen gefunden und beinhaltete eine über den Somatostatinrezeptor vermittelte Phosphorylierung des β -Catenins, die letztlich zur Inhibition des für die Zellteilung zuständigen Wnt- β -Catenin-Signalweges führte (108).

Den Unterschied in der Reaktion auf den SMS 201-995 zwischen den zwei kolorektalen Zelllinien SW480 und SW620 begründeten die Autoren mit dem unterschiedlichen Somatostatinrezeptorexpressionsgrad der Zellen. Die SW620 wurden aus einer Lymphknotenmetastase des kolorektalen Karzinoms gewonnen und waren dementsprechend schlechter differenziert als die SW480-Zellen. Demnach verfügten die SW620-Zellen über eine sehr geringe Anzahl von funktionellen Somatostatinrezeptoren im Vergleich zu den SW480, die diese wahrscheinlich in hohem Maße auf ihrer Zellmembran exprimieren und darüber in ihrer Proliferation eingeschränkt wurden. Allerdings führten Di Paolo et al. keine weiterführenden Analysen des Somatostatinrezeptorstatus durch, um ihre Hypothese zu untermauern. Auch wir analysierten nicht die Somatostatinrezeptorexpression in unseren drei untersuchten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden fünf verschiedene Somatostatinrezeptor-Subtypen (SSTR1-5) identifiziert. Jedoch wiesen die zahlreichen existenten Somatostatin-Analoga unterschiedliche Affinität zu den fünf unterschiedlichen Somatostatinrezeptor-Subtypen auf (109). So bindet beispielsweise das langwirksame Somatostatin-Analogon Octreotid an den SSTR2, die Bindungskraft für den SSTR5 fehlt aber. Als eine mögliche Erklärung wäre also hinzuzufügen, dass die SOM230-Behandlung der von uns verwendeten drei kolorektalen Tumorzelllinien daher nicht wie erwartet mit einer Proliferationsinhibition beantwortet werden konnte, da wahrscheinlich diese Zelllinien Somatostatinrezeptoren von einem bestimmten SSTR-Subtyp exprimierten, zu welchem ausgerechnet dieses Somatostatinanalogon nicht affin und somit in seiner Wirkung niedrig potent war.

5.2 Chemerin-9 stimuliert Tumorproliferation *in vitro*

Wie bereits in der Einleitung erwähnt ist Chemerin ein Protein mit multimodalen Funktionen. In mehreren Arbeiten wurde seine proinflammatorische Bedeutung in Entzündungs- sowie

Autoimmunprozessen berichtet (69,72). Das viscerale Fettgewebe produziert ebenfalls hohe Mengen an Chemerin, welches als ein wirksames Adipokin agiert und die Fettzellproliferation sowie Glukoseaufnahme ins Gewebe und Fettsäurensynthese anregt. Vor einigen Jahren fragte sich die chinesische Arbeitsgruppe um Qu nach der Rolle von Chemerin für die Tumorgenese und verglich die an einem Bronchialkarzinom erkrankten Patienten und gesunde Probanden in Hinblick auf ihre Chemerinspiegel im peripheren Blut (110). Es wurde festgestellt, dass die mittels ELISA erfasste Chemerin-Konzentration im Blut der 42 Lungenkarzinomkranken signifikant höher war als bei den 31 untersuchten Gesunden. Es konnte allerdings keine Korrelation zwischen der Chemerinkonzentration im Blut der am Lungenkrebs erkrankten Patienten und den unterschiedlichen mitberücksichtigten klinisch-pathologischen Faktoren wie Alter, Geschlecht, UICC-Staging, histopathologischer Tumortyp, Tumordifferenzierungsgrad sowie Lymphknotenbefall ermittelt werden. Nichtsdestotrotz legte diese klinische Studie nahe, dass Chemerin offensichtlich in das Tumorgeschehen involviert zu sein scheint. Wir fokussierten uns daher auf die nicht weiter charakterisierte Rolle von Chemerin für Tumorbiologie und stellten uns die Frage nach dem Malignitätspotenzial von Chemerin bei der Kanzerogenese des kolorektalen Karzinoms. Um sich der Frage zu nähern, wurde anfangs die Wirkung von Chemerin auf das kolorektale Tumorzellwachstum *in vitro* untersucht. Während des Substanzscreenings wurde der stimulatorische Einfluss von Chemerin-9, einer aktiven Variante von Chemerin mit Peptidstruktur, auf die Proliferation der drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien im DAPI-Proliferationsassay demonstriert. Die dreitägige Behandlung der Tumorzellen mit der stabilen Chemerin-9-Variante CG36 steigerte signifikant die Tumorzellzahl im Vergleich zu der entsprechenden nicht behandelten Negativkontrolle bei allen drei getesteten kolorektalen Zelllinien. Den HTCA-Ergebnissen war zu entnehmen, dass die Applikation der gleichen Substanz die Koloniezahl verglichen mit der Negativkontrolle erhöhte. Eine Zunahme der Tumorzellkolonien war bei allen drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien erkennbar, jedoch hatte diese nur bei den SW620-luc-Zellen statistische Signifikanz.

Zurückblickend auf die zum heutigen Zeitpunkt vorhandene Datenlage zum Chemerin, kann man behaupten, dass Chemerin über die Eigenschaft verfügt, die Proliferation bestimmter Körperzellen *in vitro* zu stimulieren. Zum Beispiel zeugt die Publikation von Yang von der Fähigkeit von Chemerin die Proliferation der Myoblasten zu regulieren und zu verstärken (111). Yang et al. konnten zeigen, dass die Behandlung der Myoblastenzelllinie C2C12 mit dem rekombinanten Maus-Chemerin zur einer dosisabhängigen Steigerung der Myoblastenzahl nach 72 Stunden führte. Der nachgewiesene proliferative *in-vitro*-Effekt von Chemerin auf die Myoblasten wurde offenbar durch die Aktivierung der ERK1 und ERK2 vermittelt, worauf die in

der Western blot-Analyse ermittelte Erhöhung der Phosphorylierung der ERK1/2-Proteine hinwies. Eine simultane Behandlung der Myoblasten mit Chemerin zusammen mit einem Inhibitor des ERK1/2-Signalweges PD98059 endete in der Hemmung der durch Chemerin initiierten Proliferation der Zellen. Im Gegenteil konnte die Phosphorylierung des mTOR-Proteins unter Maus-Chemerin ($c = 0,05 \mu\text{g/ml}$) reduziert werden, was den zusätzlich Beitrag des mTOR-Signalweges für die Weiterleitung des proliferativen Effektes von Chemerin unterstrich. Zusammenfassend lässt sich aus den von Yang et al. gewonnenen Ergebnissen ableiten, dass Chemerin sich als ein potenzieller trophischer Faktor für das Myoblastenwachstum erwies, wobei es sich um einen Langzeiteffekt von Chemerin handelte, der sich erst nach 72 Stunden Behandlung einstellte. Auch in unseren Experimenten konnte eine Langzeitwirkung von Chemerin in Bezug auf die Proliferation der kolorektalen Tumorzellen festgehalten werden. Die zwei Signalwege, deren Schlüsselproteine ERK1/2 bzw. mTOR waren, schienen an der Transduktion des Wachstumseffektes von Chemerin auf die Myoblastenzellen mitzuwirken. Da aber die Myoblasten Körperzellen mit einem geringen Differenzierungsgrad ähnlich wie auch die von uns untersuchten Tumorzellen repräsentierten, die von ihren Vorläuferzellfunktion aus zu einer verstärkten Proliferation neigten, ist es vorstellbar, dass in den Zellen wie auch in den Tumorzellen von vornherein die ERK1/2 sowie mTOR-Signalkaskaden aktiviert waren und Chemerin lediglich die schon aktiven Signalwege weiter antrieb, ohne diese primär zu initialisieren. Die zusätzliche durch Chemerin veranlasste Aktivierung der beiden Signalwege passierte allerdings laut Yang relativ früh, nach 24 Stunden. Der im CCK-8 kit Proliferationsassay erfasste das Myoblastenwachstum fördernde Effekt trat jedoch verzögert, erst nach 72 Stunden, ein.

In der Forschungsarbeit von Kaur et al. wurde eine stimulierende Wirkung von Chemerin auf die Proliferation eines anderen Körperzelltyps, nämlich der Endothelzellen, identifiziert (81). Dort kam es wie im Falle der Myoblasten zu einem gesteigerten *in-vitro*-Zellwachstum humaner Endothelzellen (HMECs) nach Applikation von ansteigenden Chemerinkonzentrationen. Der maximale Wachstumseffekt wurde schon nach 24 Stunden erreicht, war jedoch halb so groß wie nach der Gabe des klassischen Endothelzellenwachstumsfaktors VEGF der als Positivkontrolle diente. Die proliferative Wirkung von Chemerin wurde von einer vermehrten Phosphorylierung von p38 MAP-Kinase sowie von ERK1/2- und Akt-Proteine begleitet, darauf hinweisend, dass Chemerin im Stande war solche das Zellwachstum und -überleben vermittelnden Signalwege wie den MAPK- und Akt-Signalweg in den Endothelzellen zu induzieren. RT-PCR- und die Western blot-Analyse offenbarten das Vorhandensein vom Chemerinrezeptor CMKLR1 in den Endothelzellen. Deshalb wurde angenommen, dass der Wachstumseffekt von Chemerin auf die

kolorektalen Tumorzellen durch die spezifische Bindung von Chemerin an seinen Rezeptor vermittelt werden könnte und in Analogie zu den Myoblasten oder Endothelzellen die MAPK- und Akt-Signalkaskaden über den G-Protein-gekoppelten CMKLR1 aktiviert werden könnten.

Uns beschäftigte aber vor allem die Frage, ob Chemerin sich genauso stimulierend auf das Wachstum der malignen Zellen auswirkt, wie es bei einigen gesunden Zellen wie z. B. Myoblasten oder Endothelzellen tut. Im Hinblick auf dieses Thema fanden wir die Arbeit von Yamaguchi et al. vor. Die Wissenschaftler befassten sich ursprünglich mit der Aufbereitung von unterschiedlichen rekombinanten bioaktiven Isoformen von Chemerin (112) und stoßen auf einen in einer früheren Publikation erschienenen Befund, dass eine Chemerin-Isoform Chemerin 158K in erheblich hohen Mengen im Liquor von Patienten mit Glioblastom vorlag, verglichen mit den Chemerin-Konzentrationen im Blutplasma dieser Patienten (113). Die Arbeitsgruppe ging dann der Frage nach der Rolle von Chemerin in der Tumorbilogie von Glioblastomen nach und fand durch eine *in-silico*-Analyse von Microarray-Datenbankressourcen heraus, dass die Chemerin-mRNA-Expression in den Gliomen Grad III und IV viel höher als bei Grad II bzw. in den Epilepsiearealen reguliert war und die Behandlung der humanen U-87 MG-Glioblastomzellen mit dem Chemerin 157S einen konzentrationsabhängigen Anstieg des intrazellulären Kalziums implizierte, was als eine Anstoßung des über funktionelle Chemerinrezeptoren vermittelten Signalweges durch diese aktive Chemerinisoform zu bewerten wäre.

Auf der Grundlage unserer Resultate konnten wir schlussfolgern, dass Chemerin bzw. seine Analoga wirksame Wachstumsfaktoren für die *in-vitro*-Proliferation der kolorektalen Adenokarzinomzellen darstellten. Der Proliferationseffekt von Chemerin könnte unserer Vermutung nach spezifisch, über die auf der Zellmembran der kolorektalen Tumorzellen endogen exprimierten Chemerinrezeptoren, unter anderen über den funktionellen CMKLR1, vermittelt werden. In die Weiterleitung des infolge der Chemerin-Chemerinrezeptor-Interaktion ausgesandten Signals in den Zellkern und die Induktion der proliferativen Wirkung könnten am ehesten analog zu den Endothel- bzw. Myoblastenzellen die MAP-Kinase-, Akt- sowie mTOR-Signalwege beteiligt sein. Zur Prüfung dieser Aussage wäre z. B. der Nachweis von phosphoryliertem ERK1/2, Akt bzw. mTOR im Western blot mit Lysaten der vorher mit Chemerin über einen längeren Zeitraum von ca. 3-4 Tagen vorbehandelten kolorektalen Adenokarzinomzellen erforderlich. Für die Beantwortung der Frage inwieweit Chemerin die Formierung von Tumorzellkolonien moduliert, lieferte unsere Literaturrecherche keine Vordaten. Die Tatsache, dass das von uns benutzte Chemerin-Analogon CG36 nur eine geringgradige nicht für alle Zelllinien statistisch signifikante Stimulation der Koloniebildung

evozierte, wäre damit zu begründen, dass Chemerin zwar in der Lage sei die Tumorphiliferation *in vitro* in dem zweidimensionalen Format des DAPI-Proliferationsassays zu verstärken, kann aber die im HTCA erfasste Koloniebildung nicht stimulieren, da es sich um eine andere Tumoreigenschaft handelt. Denn der HTCA misst die Anzahl der Kolonien, die in einem dreidimensionalen Raum entstanden sind, und beschreibt somit nicht direkt den Proliferationseffekt von einer Substanz auf die Tumorzellen. Deswegen war die verstärkte Koloniebildung im HTCA mit guter Tumorgenezität in Verbindung zu bringen und könnte mit einem hohen Metastasierungspotenzial *in vivo* assoziiert sein. Auf der anderen Seite wäre es möglich, dass CG36 als eines von vielen möglichen Chemerin-Isoformen über eine geringere Aktivität in Bezug auf die Koloniebildung als auf die Proliferation verfügt. Es ist vorzustellen, dass eine andere Peptid-Isoform mit veränderter Aminosäurenabfolge sich durch eine hochpotente Wirkung auf die Tumorkoloniebildung auszeichnen könnte, wäre aber nicht wirksam beim Tumorzellwachstum, da wahrscheinlich multiple Chemerin-Isoformen unterschiedliche biologische Aktivität bezüglich der verschiedenen Tumoreigenschaften besitzen, welche ihrerseits über unterschiedliche Chemerinrezeptoren und Signalwege transduziert werden.

5.3 Aktivierung von CMKLR1 durch Chemerin-9

Wie bereits in dem vorhergehenden Kapitel erwähnt, übt Chemerin eine Zellproliferation fördernde Wirkung auf eine Reihe von Körperzellen, wie Adipozyten, Endothelzellen und Myoblasten sowie auf Tumorzellen aus (79, 81, 111, 112). Bei den Körperzellen reguliert Chemerin die Zellproliferation über die Bindung an den auf den Zellen exprimierten, funktionellen G-Protein-gekoppelten Chemerinrezeptor CMKLR1 und die nachgeschaltete Aktivierung verschiedener intrazellulärer, die Zellteilung und -überleben stimulierender Signalwege. Wir fragten uns, ob die kolorektalen Adenokarzinomzellen, für welche in *in-vitro*-Experimenten eine Proliferation sowie Koloniebildung stimulierende Wirkung von stabilem Chemerin-9 CG36 demonstriert wurde, analog zu den aufgeführten Körperzellen CMKLR1 auf ihrer Zellmembran besaßen. Es wurde überlegt, dass eine CMKLR1-Aktivierung durch die Zugabe eines Rezeptoragonisten hervorgerufen werden könnte. Zur Überprüfung der Hypothese wurde ein ITCC-Internalisierungsassay entworfen, dessen Grundprinzip in der Registrierung der Aufnahme der an ITCC-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Chemerin-9-Variante CG37 in das Zytoplasma kolorektaler Tumorzellen bestand. Die zu erwartende Internalisierung des farbstoffmarkierten CMKLR1-Liganden CG37 würde mit einem Fluoreszenzsignal einhergehen und auf die Aktivierung des CMKLR1 hinweisen. Tatsächlich wurde eine ausgeprägte

Fluoreszenzsignalintensitätszunahme und somit eine deutlich erhöhte Chemerin-9-Aufnahme in die zwei mit dem CMKLR1-Gen transfizierten Positivkontrollzelllinien (U2OS-CMKLR1 und Mia-PaCa-2-CMKLR1) verglichen mit den Wiltypzelllinien gesehen. Dies deutete zunächst daraufhin, dass Chemerin-9 sowie sein farbstoffmarkiertes Analogon CG37 an den Chemerinrezeptor CMKLR1 band und internalisiert wurde, wobei die Kopplung von Chemerin-9 an den ITCC-Farbstoff anscheinend nicht die Affinität für den CMKLR1 reduzierte. Es gelang uns bei sechs von insgesamt dreizehn untersuchten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW480, HCT116-luc, HT29-luc, Colo320, LS174T und SK-N-AS eine Bindung und Internalisierung der Chemerin-9-Variante CG37 in das Zellinnere zu identifizieren. Die relativen Peptidmengen für diese Tumorzelllinien lagen geringfügig, maximal 2,5-fach, oberhalb der gemessenen Peptidmengen der Negativkontrollzelllinien und erreichten nicht die Peptidmengenhöhe der CMKLR1 überexprimierenden Positivkontrollzelllinien. Den Grund dafür sahen wir darin, dass die 6 kolorektalen Tumorzelllinien eine endogene CMKLR1-Expression hatten. Demnach besaßen sie eine geringere Zahl von Chemerinrezeptoren auf ihrer Zellmembran und konnten weniger CG37-Moleküle binden und internalisieren als die künstlich erzeugten, CMKLR1 im Übermaß exprimierenden U2OS-CMKLR1- und Mia-PaCa-2-CMKLR1-Zelllinien, wodurch ein Fluoreszenzsignal geringerer Intensität bei den kolorektalen Tumorzellen erzeugt wurde. Eine vermehrte CG37-Aufnahme wurde bei den HT29-luc und HCT116-luc-Zellen registriert, welche auf die Chemerin-9-Behandlung in den beschriebenen *in-vitro*-Experimenten mit dem Anstieg der Proliferationsrate und der leicht verstärkten Koloniebildung reagierten. In dem Zusammenhang schien der Effekt von Chemerin-9 auf das Tumorzellwachstum *in vitro* sowie die Koloniebildung über CMKLR1 vermittelt zu sein. Eine vergleichsweise geringe endogene Chemerinrezeptorexpression im Internalisierungsassay könnte trotzdem einen signifikanten Proliferationseffekt bedingen. Denn das vom C-Terminus des Chemerins stammende Nonapeptid Chemerin-9 verfügte über eine vielfach höhere Affinität für den CMKLR1 sowie eine höhere Bioaktivität als das Chemerin selbst (75, 114). Das bedeutet, dass eine kleine CMKLR1-Rezeptoranzahl auf der Tumorzellmembran ausreichend wäre, da die Bindung von wenigen Chemerin-9-Molekülen sehr effektiv wäre und die Potenzierung des proliferativen Chemerin-Effektes im Zellinneren infolge der weiteren Signaltransduktion verursacht werden könnte. So könnte man nicht direkt über den Ausmaß der CG37-Aufnahme im Internalisierungsassay auf die Effektstärke vom Chemerin-Derivat Chemerin-9 bzw. CG36 schließen. Diese Annahme könnte uns helfen zu erklären, warum die SW620-luc-Zellen, die im HTCA sowie DAPI-Proliferationsassay positive Ergebnisse zeigten, im Internalisierungsassay allerdings negativ in Bezug auf die CG37-Bindung und -Aufnahme in das Zytoplasma waren.

Vielleicht war das von uns etablierte ITCC-Internalisierungsassay nicht sensitiv genug, um eine geringe endogene CMKLR1-Expression zu detektieren und zeigte nur eine Rezeptorüberexpression an. Es fiel uns ergänzend auf, dass die HT29-luc und HCT116-luc-Zellen andere Ergebnisse mit erhöhter nachweisbarer CG37-Aufnahme im Vergleich zu den Wildtypen im Internalisierungsassay lieferten. Die Intergration des Luziferase-Gens in das Genom der beiden Tumorzelllinien könnte theoretisch die umliegenden Gene wie auch das CMKLR1-Gen modifizieren und eine Veränderung des Zellphänotyps und somit der Zelleigenschaften zur Folge haben.

Es wäre auch möglich, dass das beobachtete relativ geringe Fluoreszenzsignal durch die Bindung von CG37 an unspezifischen Bindungsstellen zustande kam. Daher erfolgte zum Spezifitätsnachweis der Chemerin-9-Bindung an den CMKLR1 ein Verdrängungsversuch der farbstoffmarkierten Chemerin-9-Variante CG37 vom Rezeptor durch das in 100-fach höherer Konzentration zugegebene stabile farbstofffreie Chemerin-9 CG36. In Übereinstimmung mit unseren Erwartungen konstatierten wir eine Abschwächung des Fluoreszenzsignals und eine deutlich erkennbare Reduktion der CG37-Aufnahme nach der Vorbehandlung U2OS-CMKLR1- und Mia-PaCa-2-CMKLR1-Zellen mit dem im Überschuss vorhandenen CG36, welches in der Konkurrenz mit CG37 um die CMKLR1-Bindungsstellen die spezifische CG37-Anlagerung an den Chemerinrezeptor erfolgreich verhinderte. Die LS174T beantworteten den CG37-Verdrängungsversuch mit einem Anstieg der CG37-Aufnahme, was am ehesten ein Zeichen der Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Chemerin-9 an die unspezifischen Bindungsstellen auf der LS174T-Zelloberfläche anstatt an den CMKLR1 repräsentierte. In den HCT116-luc- und Colo320-Zellen blieb die CG37-Aufnahme nach der Verdrängung unverändert. In drei Tumorzelllinien SW480, HT29-luc und SK-N-AS nahm die Fluoreszenzsignalintensität und damit die CG37-Internalisierung nur geringfügig ab, nachdem versucht wurde, die CMKLR1-Affinitätsstellen mit dem CG36 anstatt des farbstoffmarkierten CG37 zu besetzen. Wir argumentieren die beobachtete geringe bis fehlende Verdrängung des CG37 durch den farbstofffreien Konkurrenten in den untersuchten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien dadurch, dass der Verdrängungseffekt wegen der im Internalisierungsassay nachgewiesenen geringen endogenen CMKLR1-Expression nicht so ausgeprägt ausfiel. Es wurde diskutiert, ob die getesteten Tumorzellen nicht über andere Chemerinrezeptorsubtypen verfügten, welche die CG37-Bindung und Internalisierung vermitteln könnten. Es existieren neben CMKLR1 zwei andere Chemerinrezeptoren CCRL2 und GPR1. CCRL2 kam eher nicht in Frage, da es kein funktioneller Rezeptor ist und deshalb keine Internalisierung des Chemerins ermöglicht. Es dient lediglich der Präsentation des gebundenen

Chemerins an die benachbarten Zellen (72). GPR1 ist analog zum CMKLR1 ein funktioneller G-Protein-gekoppelter Chemerinrezeptor mit hoher Affinität sowie einer Internalisierungsoption für Chemerin (115). Die Chemerinbindung an den GPR1 resultiert in einer Kalziummobilisierung sowie ERK1/2-Aktivierung in den gesunden Körperzellen. GPR1 könnte auch endogen auf den kolorektalen Tumorzellen exprimiert sein und die proliferative Chemerin-9-Wirkung vermitteln, aber auch als ein alternativer Rezeptor-Kandidat CG37 binden und zu seiner Internalisierung mit der detektierten geringen Fluoreszenzsignalintensitätserhöhung führen. Andererseits wenn wir bedenken, dass GPR1 eine höhere Affinität für den CG37 als den CG36 wegen der ITCC-Kopplung aufweisen könnte, würde die Verdrängung des CG37 durch das CG36 entsprechend unseren Beobachtungen nur geringgradig sein.

Auf der anderen Seite sollte versucht werden die Ergebnisse aus dem Internalisierungsassay mit anderen Methoden zu bestätigen oder zu widerlegen. Wenn wir glauben, dass für die Weiterleitung des Proliferationseffektes von Chemerin-9 der CMKLR1 verantwortlich sei, könnten wir die endogene CMKLR1-Expression auf den Tumorzellen zum Beispiel mittels gegen CMKLR1 gerichteter Antikörper in der Immunofluoreszenz nachweisen oder mithilfe von passenden siRNAs auf der mRNA-Transkriptionsebene ausschalten. Zabel et al. verwendeten die spezifischen Ratte-Antikörper gegen humanen CMKLR1, die nach der Immunisierung der Ratten mit dem KLH-Konjugat des N-terminalen CMKLR1-Peptids generiert wurden (116). Sie konnten mithilfe des neuen Ratte-Antikörpers die CMKLR1-Expression auf den im menschlichen Blut zirkulierenden unreifen plasmazytoiden dendritischen Zellen nachweisen, die myeloiden dendritischen Zellen wie auch Lymphozyten, Neutrophile und Monozyten exprimierten keinen CMKLR1. Goralski et al. überprüften die Transduktion des Chemerineffektes über den CMKLR1 mithilfe einer anderen Methode. Dazu wurde die angenommene CMKLR1-Expression zunächst mit den vom Adenovirus stammenden short hairpin RNAs (shRNAs) supprimiert und darunter die Chemerinwirkung angeschaut (117). Die Arbeitsgruppe machte sich die Methode der selektiven Ausschaltung der gewünschten Gene durch kleine doppelsträngige RNA-Moleküle zunutze, die mit der komplementären CMKLR1-m-RNA interagierten und zu ihrer Degradierung mit dem Ausfall der Chemerinrezeptortranslation führten, um auf diese Art den funktionellen Beitrag des CMKLR1 zur Adipozytendifferenzierung zu beurteilen.

Als Nächstes wollten wir die Aufnahme des an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Chemerin-9 CG37 in die humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen unter den *in-vivo*-Bedingungen bewerten. Dazu wurden die Nacktmäusen mit den Tumoren der drei im DAPI-

Proliferationsassay sowie im HTCA positiven kolorektalen Tumorzelllinien HT29-luc, SW620-luc und HCT116-luc sowie ihrer Wildtypen (HT29, SW620) inokuliert und das infolge der Aufnahme des Peptids in die subkutan lokalisierten Tumore erzeugte Fluoreszenzfarbstoffsignal wurde in der *in-vivo*-Nahinfrarotbildgebung gemessen. Es konnte eine CG37-Anreicherung in den Tumoren aller 5 untersuchten Tumorzelllinien festgestellt werden. Die Signalintensität und die damit verbundene CG37-Akkumulation variierten jedoch zwischen den verschiedenen kolorektalen Tumorzelllinien, wobei die erreichte Größe des subkutanen Tumors ausschlaggebend zu sein schien. Die SW620-luc- und SW620-Zellen proliferierten schneller in den Mäusen und formierten die größten Tumore, die entsprechend die höchsten Menge an CG37 akkumulierten. Die *in vivo* langsam gewachsenen und dadurch kleinen HT29-luc-Tumore nahmen aufgrund ihres geringeren Volumens bzw. Größe weniger CG37 auf. Eine selektive Aufnahme vom fbstoffgekoppelten Chemerin in die kolorektalen Tumore könnte der Markierung der Tumore dienen und für die Tumordetektion *in vivo* angewendet werden. CG37 wäre somit ein geeigneter Kandidat für den Einsatz als ein Marker für die Tumorbildgebung.

Im Verdrängungsversuch konnte nach der vorhergehenden Applikation von CG36 in 22-fach höherer Konzentration zum CG37 keine erhoffte Fluoreszenzsignalabschwächung und damit Reduktion der CG37-Aufnahme durch die Belagerung der CMKLR-1-Bindungsstellen durch das nicht leuchtende CG36 veranschaulicht werden. In den Tumoren aller Zelllinien, außer HT29 kam es zur verstärkten CG37-Akkumulation nach der Verdrängung. Es müsste aber angemerkt werden, dass die Kenntnis der Versuchsbedingungen für die Interpretation dieser Ergebnisse von Bedeutung ist. Der Verdrängungsversuch konnte nämlich ca. 1 Woche nach der Untersuchung der *in-vivo*-CG37-Aufnahme durchgeführt werden, weil für die vollständige CG37-Elimination aus den Tumoren entsprechend den vorherigen Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe ein Zeitabstand von ca. einer Woche notwendig war. In der Zwischenzeit waren die subkutanen Tumore gewachsen und akkumulierten daher wegen zugenommener Größe mehr CG37 trotz der Verdrängung mit CG36. Die Vergleichsgruppe beinhaltete aber die kleineren Tumore aus der *in-vivo*-Bildgebung von vor einer Woche, die kleinere CG37-Mengen damals anreicherten und weniger intensiver leuchteten. Leider war es aus den oben aufgeführten Gründen nicht möglich eine Vergleichsgruppe zu schaffen, die unmittelbar nach der CG37-Aufnahme-Untersuchung die Verdrängung des CG37 mit CG36 erhielt. Beispielsweise wiesen die SW620-luc-Tumore eine besonders steile Wachstumskurve auf und verdoppelten ihre Größe nach einer Woche, sodass sie bei der Korrelation zwischen Tumorumfang und CG37-Akkumulation doppelt so viel CG37 aufnehmen konnten, als es vor einer Woche der Fall war und der Verdrängungseffekt von CG36 auf die CG37-Aufnahme, der durchaus beim adäquaten

Vergleich bestehen könnte, einfach untergegangen war. Bei den HT29-Tumoren, die in einer Woche nicht wesentlich weiter gewachsen sind und keine relevante Größenänderung zeigten, konnte der Vergleich mit den CG37 behandelten Tumoren von vor einer Woche noch gemacht werden und man sah tatsächlich einen leichten Verdrängungseffekt von CG36 mit der Abnahme der CG37-Anreicherung in den Tumoren. Vielleicht war die CG36-Konzentration nicht hoch genug für einen signifikanten Verdrängungseffekt und es konnte kein CG36-Überschuss für die Überlegenheit von CG36 über den CG37 bei der Chemerinrezeptorbesetzung aufgebaut werden. In dem Tierversuch wurde aber Abstand von einer CG36-Konzentrationssteigerung gehalten, da CG36 im DMSO gelöst wurde und eine höhere CG36-Konzentration würde auch eine Konzentrationserhöhung des toxischen Stoffes in der Lösung bedeuten, was nach der i.v.-Injektion zum möglichen Tod der Tiere geführt hätte. Außerdem mangelte es an einer Negativkontrolle, von der wir definitiv wussten, dass die Tumorzelllinie kein CG37 anreichert.

Die gewonnenen Daten aus der *in-vivo*-Bildgebung waren nicht unbedingt deckungsgleich mit den Resultaten des Internalisierungsversuchs *in vitro*, die eine fehlende CG37-Internalisierung in den HT29-, SW620-luc- und SW620- Zellen anzeigten. Bei der Betrachtung der *in-vivo*-CG37-Aufnahme-Ergebnisse sollte nicht vergessen werden, dass unter den *in-vivo*-Bedingungen im Mausorganismus unterschiedliche oft komplizierte Einflüsse und Interaktionen zwischen den injizierten humanen Tumorzellen und dem umliegenden Bindegewebe sowie dem Immunsystem der Mäuse denkbar wären. Wir interpretierten die CG37-Anreicherung in den kolorektalen Tumoren als eine vermutlich über den CMKLR1 vermittelte Aufnahme der farbstoffmarkierten Chemerin-9-Variante in die Adenokarzinomzellen. Neben den eingebrachten humanen Tumorzellen könnte auch andere aus der Maus stammenden Zellen CMKLR1 exprimieren, darüber CG37 binden und die erkennbare CG37-Akkumulation bewirken. Die gespritzten humanen Tumore lösten eine inflammatorische Umgebungsreaktion mit Einwanderung der Makrophagen und Neutrophilen bei den immundefizienten Nacktmäusen aus, denen es zwar an der T- und B-Lymphozytenproduktion mangelt, bei denen aber das angeborene Immunsystem noch funktionierte. Eine Chemerinrezeptorexpression, vor allem des CMKLR1 ist in den Makrophagen und neutrophilen Granulozyten vorbeschrieben (115, 118), sodass die CG37-Akkumulation in den Tumoren auch von der CG37-Anlagerung an die CMKLR1 der umgebenden Immunzellen herrühren könnte.

Es konnte zunächst eine Aufnahme des farbstoffgekoppelten Chemerin-9 in die kolorektalen Tumore vorgeführt werden, was auf die Bedeutung von Chemerin-9 im malignen Geschehen hinwies. Wie aber das aufgenommene Chemerin-9 *in vivo* agiert und welche Rolle es für die

Tumorproliferation *in vivo* spielt, könnte am besten in dem weiterführenden Therapieversuch mit stabilem Chemerin-9 geklärt werden.

5.4 Chemerin-9 stimuliert das kolorektale Karzinomwachstum *in vivo*

Nachdem ein stimulatorischer Effekt von Chemerin-9 auf das Tumorwachstum *in vitro* bei drei kolorektalen Adenokarzinomzelllinien registriert wurde, wollten wir wissen, ob dieser Proliferationseffekt von Chemerin-9 auch unter den *in vivo*-Bedingungen persistiert. Denn bekanntermaßen wird das Verhalten der malignen Zellen im lebenden Tierorganismus durch das tumorassoziierte Bindegewebe mit den von Fibroblasten oder anderen Umgebungszellen sezernierten Wachstumsfaktoren oder anderen Botenstoffen sowie durch die Kontrolle des Immunsystems beeinflusst, sodass sich der Prozess der Tumorgenese und –progression unter *in-vivo*-Konditionen infolge der dazu kommenden geschilderten Interaktionen viel komplizierter als in der Zellkultur ohne externe Einflüsse gestaltet. Wir führten einen Behandlungsversuch durch, in dem die Nacktmäuse, denen subkutane kolorektale Adenokarzinome zweier Zelllinien, HT29-luc und HCT116-luc, gesetzt wurden, mit dem stabilen Chemerin-9 CG34 versus Wasser als Kontrolle über 23 Tage behandelt wurden. Am Ende des Interventionsversuchs erhielten wir das Ergebnis, dass das mithilfe von zwei voneinander unabhängigen Messmethoden, der Kallipermessung und der Biolumineszenz-Bildgebung, ermittelte Tumolvolumen sowie das Tumorgewicht in der Behandlungsgruppe signifikant größer waren als in der Kontrollgruppe. Der proliferative Effekt von Chemerin-9 *in vivo* traf für beide untersuchten Tumorzelllinien zu. Außerdem wurde bemerkt, dass unsere *in-vitro*-Befunde kongruent mit den gewonnenen *in-vivo*-Daten waren und Chemerin-9 sich als ein potenter Wachstumsfaktor für das kolorektale Tumorwachstum *in vivo* positionierte.

Unserer Erkenntnis widersprachen jedoch die von der Forschungsgruppe um Pachynski publizierte Daten. Pachynski et al. postulierten eine gegenläufige antiproliferative Wirkung von Chemerin in einer anderen Tumorentität, nämlich im Hautmelanom (119). Sie erzeugten mit dem Chemerin-Gen RARRES2 transfizierte Klone der Melanomzelllinie B16 und injizierten diese in das subkutane Gewebe der Nacktmäuse. Die Chemerin-produzierenden Tumore wuchsen langsamer als die Melanome der mit dem Kontrollvektor ohne Chemerin-Gen transfizierten Klone bzw. der Wildtypzelllinie. *In vitro* wurde jedoch kein Unterschied in der Proliferation zwischen den mit dem Chemerin-Gen-transfizierten und den Kontrollklonen bzw. Wildtypmelanomzellen fixiert, sodass sich die Schlussfolgerung aufzwang, dass Chemerin keinen direkten Wachstumseffekt auf die Melanomzellen besaß, sondern die Tumorumgebung beeinflusste. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass das Tumorgewebe der mit dem Chemerin-

Gen transfizierten B16-Klone aus dem *in-vivo*-Versuch mit den CD45 positiven Leukozyten, den T-Lymphozyten und vor allem den „Natural killer“ (NK)-Zellen vermehrt infiltriert war, im Vergleich zum Tumorgewebe der nicht Chemerin exprimierenden Kontrollgruppe. Die Anzahl der Myeloid-derived suppressor Zellen (MDSCs) sowie der plasmoiden dendritischen Zellen im Chemerin freisetzenden Tumorgewebe war reduziert. Die NK-Zellen stellen einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar und sind an der gegen maligne Zellen gerichteten Immunantwort beteiligt. Die Tumorstillungsinhibition in den mit dem Chemerin-Gen transfizierten Tumoren kam wahrscheinlich durch eine verstärkte Einwanderung der durch das sezernierte Chemerin angelockten NK-Zellen. Die effektive Tumorstillungsinhibition erforderte aber Expression der Chemerinrezeptoren, wie CMKLR1, auf den Wirtszellen. Im weiteren Experiment wurde Chemerin lokal in die Tumore der Wildtypzellen der Melanomzelllinie B16 verabreicht. Diese Behandlung der Melanome mit dem aktiven Chemerin löste ebenfalls eine Stillungsinhibition des Tumorstillungsinhibition aus. Abgeleitet aus den oben beschriebenen Versuchen vermochte Chemerin also die Immunabwehrmechanismen des Wirtes, vor allem in Form von NK-Zellen, zu rekrutieren und auf diese Weise den Tumorstillungsinhibitionprozess zu unterbrechen.

In der klinischen Studie von Lin et al. wurde ebenfalls der Zusammenhang zwischen der immunstimulierenden Wirkung von Chemerin und der Verlangsamung des Tumorstillungsinhibition gewürdigt (120). Es wurde eine geringere Expression von Chemerin in dem Leberkarzinomgewebe als in dem gesunden Lebergewebe konstatiert. Je niedriger die Chemerin-Expressionsrate war, desto schlechter fiel die Überlebensrate und somit die Prognose der am hepatozellulären Karzinom erkrankten Patienten. Die Lebertumorstillungsinhibition, in denen ein etwas höheres Expressionsniveau von Chemerin nachgewiesen werden konnte, zeichneten sich durch eine geringere Tumorstillungsinhibition und einen höheren Differenzierungsgrad aus und waren mit einer Infiltration der Immunzellen wie der NK-Zellen und der dendritischen Zellen behaftet. Allerdings machte sich Chemerin auch in diesem Fall, dieses Mal eines Leberkarzinoms, seine Fähigkeit eines Chemokins die Immunzellen anzuziehen zu Nutze und unterdrückte durch den indirekten Mechanismus der lokalen Immunsystemstimulierung das maligne Wachstum. Das Fortschreiten des Tumorstillungsinhibition ereignete sich durch eine Herunterregulation der Chemerinbildung, die von einer verringerten Chemerinwirkung auf die Immunzellen und der Einstellung einer immunsupprimierten Lage in der Tumorumgebung begleitet wurde. In einigen vorhergehenden Arbeiten fand eine Herunterregulation oder sogar eine totale Abschaltung der Chemerin-Gene, wie RARRES2 (retinoic acid receptor responder (tazarotene induced)), in einer Reihe von humanen soliden Tumoren wie Prostatakarzinom,

Adrenokortikales Karziom, Melanom sowie Kolonkarzinom Erwähnung (121-124). Oft ging dabei eine höhere Chemerin-mRNA-Expressionsrate mit einer besseren Prognose einher. Diese Beobachtungen stützten ebenfalls die Hypothese von Pachynski von der Notwendigkeit der Chemerin-Expression für die Immunprotektion und somit für die Unterdrückung der Tumorentstehung bzw. -progression. Eine den bisher unaufgeklärten Mechanismen geschuldete Herunterregulation der Transkription der Chemerin-DNA könnte scheinbar die lokale Immunabwehr durchbrechen und günstige Bedingungen für das schnelle Tumorwachstum schaffen.

In allen hier vorgebrachten Publikationen wurde auf eine indirekte Wirkung von Chemerin auf das Tumorwachstum *in vivo* aufmerksam gemacht, die via Invasion von Immunzellen zustande gebracht wurde. Die Immunzellen exprimieren ihrerseits Chemerinrezeptoren, wie z. B. CMKLR1, die sie sensitiv genug für das Chemerin-Signal machen. Rama et al. demonstrierten, dass es auch in der sogenannten Tumormikroumgebung, zu der auch die erwähnten Immunzellen zählen, es andere Interaktionen existierten, die über den Chemerinrezeptor liefen (125). Dabei war es nicht ausschließlich Chemerin, das die Chemerinrezeptoren beeinflusste, sondern die Tumorzellen selbst, die die CMKLR1-Expression regulierten. In einem *in-vitro*-Makrophagen-Ko-Kultivierungsmodell wurde die Makrophagenzelllinie J744A.1 zusammen mit den Mammakarzinomzellen 4T1 bzw. den Lungenkarzinomzellen LLC1 kultiviert. Diese Ko-Kultivierung mit den Tumorzellen mündete in einer Erhöhung der CMKLR1-Expression auf den Makrophagen, die vorher eine sehr niedrige CMKLR1-Expression besaßen. Der Transforming growth Faktor- β , der in hohen Mengen von den für die Ko-Kultur verwendeten Tumorzelllinien freigesetzt wurde, sowie auch andere von den malignen Zellen stammenden, nicht genau definierten Wachstumsmediatoren wurden als verantwortlich für die Induktion der CMKLR1-Expression auf den Makrophagen betrachtet. Als die mit den Tumorzellen inkubierten Makrophagen einer Behandlung mit Chemerin unterzogen wurden, stieg die Expression der proinflammatorischen Zytokine, wie Il-12, TNF und IL-1 β in den Makrophagen an, was unserer Ansicht nach erneut die positive proinflammatorische Wirkung von Chemerin auf die Funktion der die Tumorzellen umgebenden Immunzellen wie Makrophagen betonte. All diese Ergebnisse deuteten ein kompliziert vernetztes Zusammenspiel nicht nur zwischen Chemerin und den Immunzellen, sondern auch zwischen den Tumorzellen selbst und dem lokalen Immunsystem an, das sich in eine heutzutage noch unreife Vorstellung von den Tumormikroumgebungsreaktionen einfügte.

Wir sind aber davon überzeugt, dass Chemerin ergänzend zu den geschilderten zahlreichen Wechselwirkungen direkt das Wachstum von kolorektalen Tumorzellen *in vivo* beeinflussen

könnte. Um diese Hypothese zu verifizieren, benötigten wir eine histologische Untersuchung der am Versuchsendpunkt im Rahmen der Autopsie entnommenen Tumore. Wir hofften, dass die Betrachtung der Mikroanatomie der Tumore uns den Schlüssel zur Erklärung der Gründe für den Unterschied in der Tumorphiliferation zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe geben würde. Wir richteten unser Augenmerk primär auf den Vaskularisierungsgrad, die Proliferationsrate, Nekrosezeichen und Lymphozyteneinwanderung, die mithilfe von histologischen Spezialfärbungen beurteilt wurden. Unsere Ergebnisse aus der Immunfluoreszenz mit den anti-Maus-CD45-Antikörpern bestätigten nicht die Beobachtungen von Pachynski et al., die eine Infiltration der CD45 positiven Lymphozyten in das Melanomgewebe der Chemerin exprimierenden Klone vorführten (119). Wir sahen keine Einwanderung der CD45 tragenden Lymphozyten in das Tumorrinnere bzw. zwischen die einzelnen Tumorzellen in den mit Chemerin therapierten Tumoren. Die Lymphozyten befanden sich lediglich im Mausbindegewebe um die Tumore beider kolorektaler Adenokarzinomzelllinien, wobei kein Unterschied zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe ersichtlich wurde, sodass am ehesten keine sich auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen *in vivo* auswirkende Interaktion zwischen Chemerin-9 und den Immunzellen stattfand. Die Infiltration der NK-Zellen, die keine CD45-Marker auf ihrer Zellmembran exprimieren, konnte allerdings nicht mitbestimmt werden. Wir stellten uns aber vor, wäre die Chemerin-Behandlung der subkutanen kolorektalen Tumore mit einer erhöhten Invasion von NK-Zellen assoziiert, würde diese für einen langsameren Wachstum in der Behandlungsgruppe wegen der Eliminierung der Tumorzellen durch die angelockten NK-Zellen sorgen, was aber nicht in unserem Behandlungsversuch beobachten werden konnte. Daher denken wir, dass die Induktion des lokalen Immunsystems in Form von Lymphozyten oder NK-Zellen für unsere Resultate keine Rolle spielte und andere Mechanismen für den schnelleren Tumorstadiumsverlauf in der CG34-Behandlungsgruppe verantwortlich seien.

Es wurde einerseits angenommen, dass das stabile Chemerin-9 direkt über die Bindung an seine Chemerinrezeptoren auf den humanen Tumorzellen und die Aktivierung der die Zellproliferation stimulierenden Signalwege, wie z. B. der MAP-Kinase-Kaskade, das Tumorstadium *in vivo* steuerte, was sich in einer höheren Proliferationsfraktion der behandelten Tumore reflektiert. Tatsächlich präsentierten die HCT116-luc-Tumore eine signifikant höhere Ki67-Expression in der Behandlungsgruppe als in der Kontrollgruppe. Bei den mit CG34 behandelten HT29-luc-Tumoren lag die Zahl der Ki67 positiven Zellen auch höher als in den Kontrolltumoren. Dass die HCT116-luc-Tumore eine vielfach höhere Ki67-Rate als die HT29-luc-Tumore besaßen, sprach für eine viel rasantere Proliferation und eine geringere Teilungszeit in den HCT116-luc-Tumoren. Paradoxerweise hatten die HCT116-luc-Tumore ein viel kleineres Tumorgewicht und

Tumorzellen im Verlauf und am Ende des Behandlungsversuchs als die HT29-luc-Zellen mit geringerer Proliferationsrate. Diese „Unstimmigkeit“ wurde damit erklärt, dass die HCT116-luc-Tumore verglichen mit den HT29-luc-Tumoren viele Nekroseareale in der HE-Färbung aufwiesen. Außerdem besaßen die HCT116-luc-Tumore geringere Gefäßzahl als die HT29-luc-Tumore. Das heißt, dass die HCT116-luc-Zellen sich viel zu schnell geteilt haben, ohne dass die Vaskularisierung nachkommen und die für die Zellteilung notwendige Nährstoffversorgung gewährleistet werden konnte, was schließlich zum nekrotischen Zelluntergang mit dem damit im Zusammenhang stehenden kleineren Tumorzellen geführt hat. Die Chemerin-9-Applikation beschleunigte am ehesten noch weiter das ohnehin rasante HCT116-luc-Tumorzellenwachstum.

Eine andere Option für die Stimulation des Tumorzellenwachstums stellte eine verbesserte Tumorzellenvaskularisierung dar. Aus der oben aufgeführten Publikation von Kaur haben wir erfahren, dass Chemerin die Endothelzellproliferation auslöste, indem es sich unterschiedlicher Proliferationssignalwege wie MAP-Kinase- bzw. Akt-Signalweges bediente (81). Die Behandlung mit dem langwirksamen Chemerin-9-Analogon CG34 könnte theoretisch die Angiogenese in den Tumoren in Gang gesetzt haben. So waren die HT29-luc-Tumore aus der Behandlungsgruppe besser vaskularisiert als in der Kontrollgruppe, was aus der Ermittlung einer höheren Gefäßzahl in den mit CG34 therapierten Tumoren hervorging. Eine ausgeprägte Gefäßversorgung könnte die HT29-luc-Tumore anderes als die viel schlechter vaskularisierten HCT116-luc-Tumore vor der Nekrose bewahren. Möglicherweise war das dokumentierte höhere Wachstum in den HT29-luc-Tumoren nicht nur durch eine etwas erhöhte Proliferationsrate, sondern auch durch eine zweite Komponente, nämlich die bessere Vaskularisierung und damit Nährstoffzufuhr für die Tumorzellen bedingt, wobei diese beiden Vorgänge, das Gefäß- sowie Tumorzellenwachstum *in vivo* durch Chemerin-9 gleichermaßen induziert wurden. Bei den HCT116-luc unterschieden sich die Gefäßzahlen nicht in den beiden Gruppen, sodass der erarbeitete Erklärungsansatz für die Tumore dieser Zelllinie nicht gegriffen hat.

Sicherlich waren die aufgeführten Unterschiede in dem Vaskularisierungsgrad bzw. der Ki67-Proliferationsrate zwischen den beiden Gruppen für beide Tumorzelllinien nicht sehr groß bzw. nicht immer statistisch signifikant und es bestanden große Standardabweichungen von den Mittelwerten, was unter anderem an der geringen Versuchstierzahl (6 Tiere pro Gruppe) lag. Auch bei der kritischen Betrachtung unserer Behandlungsversuchsergebnisse zum Tumorgewicht und Tumorzellenvolumen am Versuchsendpunkt fielen die bereits erwähnten großen Standardabweichungen sowie Mangel an statistischer Signifikanz auf, die wir durch Rekrutierung von doppelt so viel Tieren in die Behandlungs- und Kontrollgruppe mit der daraus automatisch resultierenden Erhöhung der statistischen Kraft umgehen könnten.

In den folgenden Experimenten gedenken wir die CMKLR1-Expression in den HT29-luc- und HCT116-luc-Tumoren aus dem Interventionsversuch zu untersuchen. Wir erwarten, dass die Langzeit-Chemerin-9-Behandlung die Anzahl der Chemerinrezeptoren auf der Zellmembran der humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen steigern würde, sodass die direkte über die spezifischen Chemerinrezeptoren vermittelte proliferative Chemerinwirkung sich potenzieren und in der Volumen- bzw. Gewichtszunahme der behandelten Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe äußern könnte. Dazu wäre eine Doppelfärbung mit den anti-Maus-CD45-Antikörpern und den anti-CMKLR1-Antikörpern in der Immunfluoreszenz notwendig. Wir könnten die CMKLR1 positiven Lymphozyten von den ebenfalls CMKLR1 positiven humanen Tumorzellen durch eine zusätzliche Markierung der Lymphozyten mit den anti-CD45-Antikörpern unterscheiden. Zur Detektion des subtilen Unterschiedes in der CMKLR1-Expression zwischen der mit CG34 vorher behandelten und nicht behandelten Tumoren wäre die Extraktion der kolorektalen Tumorzellen mit Reinigung vom umgebenden Bindegewebe und Erzeugung einer reinen Adenokarzinomzellkultur mit nachfolgendem Rezeptornachweis mittels der Immunfluoreszenzmethode auf den einzelnen extrahierten Tumorzellen effektiver.

Auf der anderen Seite könnten die Unterschiede im Tumorwachstum zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe daher rühren, dass Chemerin-9 die Apoptose in den behandelten kolorektalen Tumorzellen verlangsamt, indem es in die Apoptosesignalwege, anstatt wie vorher angenommen in den MAP-Kinase-Signalweg eingriff und diese ausschaltete. Um diese Hypothese zu beweisen, müsste man das nach dem Interventionsversuch entnommene Tumorgewebe auf die Expression der typischen Apoptosemarker, wie p53, Annexin V, Cytochrome C bzw. Caspasen mittels spezieller Apoptosekits bzw. Western blot explorieren. Erwartungsgemäß würde man eine Herunterregulation der an der Zellapoptose beteiligten Proteine in den mit CG34 behandelten Tumoren im Vergleich zu den Kontrollgruppentumoren antreffen.

5.5 Ausblick

Anhand der im Rahmen dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse wurde Chemerin als ein potenter Wachstumsfaktor für das kolorektale Tumorwachstum *in vitro* und *in vivo* angesehen. Chemerin kristallisierte sich als ein mögliches Zielprotein für eine spezifische selektive Tumorthherapie aus. Die Entwicklung von löslichen monoklonalen Antikörpern, die sich gegen Chemerin richteten, stellte einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt dar. Die entstandenen Chemerin-Chemerinantikörper-Komplexe könnten von den Immunzellen wie z. B. Makrophagen oder

Neutrophilen über die Fc-Domäne erkannt und eliminiert werden. Über die Reduktion des zirkulierenden Chemerins könnte eine Hemmung des Tumorwachstums ermöglicht werden.

Die Chemerinrezeptoren, unter anderem CMKLR1, repräsentierten ebenfalls geeignete Zielmoleküle für eine antineoplastische Therapie. Es könnten die gegen CMKLR1 gerichteten Antikörper oder CMKLR1-Liganden zum Einsatz kommen, die die Chemerinrezeptoren neutralisieren und die Fortleitung der durch Chemerin zum Zweck der Tumorphiliferation initialisierten Signalkaskaden blockieren würden. Perspektivisch könnten auch die nicht funktionellen Chemerin-Isoformen, an welche Chemotherapeutika gekoppelt wurden, als CMKLR1-Liganden fungieren. Mithilfe der Strategie könnten die Zytostatika zielgerichtet in die proliferierenden CMKLR1-exprimierenden Tumorzellen gelangen und nur die Tumorzellen anstatt der gesunden Körperzellen in ihrer Zellteilung limitieren.

6. Literatur

1. Jemal A., Thomas A. et al.: Cancer statistics, 2002. CA, Cancer J Clin 2002; 52: 23-47
2. Dietel M., Suttorp N. et al.: Onkologie und Hämatologie. Harrisons Innere Medizin. Band 1. 16. Auflage ed. Berlin, Deutschland: AB Wissenschaftsverlag 2005: 557-562
3. Vargas A. J., Thompson P. A. et al.: Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk, Nutr Clin Pract 2012; 27: 613-
4. Piper W.: Krankheiten der Verdauungsorgane. Innere Medizin. 1. Auflage ed. Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag 2007: 379-383
5. Vagefi P.A., Longo W.E.: Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease, Clinical Colorectal Cancer 2005; 4: 313–319.
6. Riede U. N., Werner M. et al.: Digestorisches System. Allgemeine und spezielle Pathologie. 5. Auflage ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag 2004: 723-725
7. Netter F. H.: Dünn- und Dickdarm. Allgemeinmedizin. 1. Auflage ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag 2006: 356-359
8. Löffler G., Petrides P. E. et al.: Kommunikation zwischen Zellen: Extrazelluläre Signalmoleküle, Rezeptoren und Signaltransduktion. Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage ed. Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag 2007: 785-789
9. Linnemann M., Kühl M.: Prinzipien der Signaltransduktion. Biochemie für Mediziner. 7. Auflage ed. Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag 2005: 513-516
10. Cunningham M. P., Thomas H. et al.: Co-targeting the EGFR and IGF-IR with anti-EGFR monoclonal antibody ICR62 and the IGF-IR tyrosine kinase inhibitor NVP-AEW541 in colorectal cancer cells, International Journal of Oncology 2008; 33: 1107-1113
11. Lu Y., Zi X. et al.: Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin), J Natl Cancer Inst 2001; 93: 1852-1857
12. Jones H. E., Goddard L. et al.: Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells, Endocr Relat Cancer 2004; 11: 793-814.
13. Diedrich K., Holzgreve W. et al.: Gut- und bösartige gynäkologische Tumore. Gynäkologie & Geburtshilfe. 2. Auflage ed. Heidelberg, Springer Verlag 2007: 267-288
14. Thaker P. H., Lutgendorf S. K. et al.: The neuroendocrine impact of the chronic stress cancer, Cell Cycle 2007; 6: 430-433
15. Rasmuson T., Ljungberg B. et al.: Increased serum cortisol levels are associated with high tumour grade in patients with renal cell carcinoma, Acta Oncologica: 40: 83-87

16. Mazzoccoli G., Carughi S. et al.: Melatonin and cortisol serum levels in lung cancer patients at different stages of disease, *Med Sci Monit* 2005; 11: 284-288
17. Zubelewicz-Szkodzinska B., Muc-Wierzgon M. et al.: Dynamics of circadian fluctuations in serum concentration of cortisol and TNF-alpha soluble receptors in gastrointestinal cancer patients, *Oncol Rep* 2001; 8: 207-212
18. Sephton S. E., Sapolsky R. M. et al.: Diurnal cortisol rhythm as a predictor of breast cancer survival, *Journal of the national Cancer Institute* 2000; 92: 994-1000
19. Touitou Y., Bogdan A. et al.: Disruption of the circadian patters of serum cortisol in breast and ovarian cancer patients: relationships with tumour marker antigens, *Br J Cancer* 1996; 74: 1248-1252
20. Walker M. J., Lim C. et al.: Effekts of glucocorticoid on the growth of human fibrosarcoma cell line HT-1080, *Cancer Research* 1986; 46: 4927-4932
21. Zhao X. Y., Malloy P. J. et al.: Glucocorticoid can promote androgen-independent growth of prostate cancer cell through a mutated androgen receptor, *Nature Medicine* 2000; 6: 703-706
22. Bernabé D. G., Tamae A. C. Et al.: Stress hormones increase cell proliferation and regulate interleukin-6 secretion in human orals squamous carcinoma cells, *Brain, Behav Immun* 2011; 25: 574-583
23. Mortan T.J., Gray S. et al.: The glucocorticoid receptor mediates a survival signal in human mammary epithelial cells, *Cancer Res* 2000; 60: 867-872
24. Simon W. E., Albrecht M. et al.: In vitro growth promotion of human mammary carcinoma cells by steroid hormones, tamoxifen and prolactin, *J Natl Ccancer Inst* 1984; 73: 313-321
25. Nakane T., Szentendrei T. et al.: Effects of IL-1 and cortisol on β -adrenergic receptor, cell proliferation and differentiation in cultured human A549 lung tumor cells, *J Immunol* 1990; 145: 260-266
26. Shang Z. J., Liu K. et al.: Expression of β 2-adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma, *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 371-376
27. Schuller H. M. and Cole B.: Regulation of cell proliferation by β -adrenergic receptors in a human lung adenocarcinoma cell line, *Carcinogenesis* 1989; 10: 1753-1755
28. Liou S. F., Lin H. H. et al.: Inhibition of human prostate cancer cells proliferation by a selective alpha1-adrenoreceptor antagonist labedipinedilol-A involves cell cycle arrest and apoptosis, *Toxicology* 2009; 256: 13-24
29. Lutgendorf S. K., Cole S. et al.: Stress related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines, *Clin Cancer Res*: 2003; 9: 4514-4521

30. Sood A. K., Bhatti R. et al.: Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells, *Clin Cancer Res* 2006: 12: 369-375
31. McGregor B. A. and Antoni M. H.: Psychological intervention and health outcome among women treated for breast cancer: a review of stress pathways and biological mediators, *Brain Behav Immun* 2009: 23: 159-166
32. Perron L., Bairati I. et al.: Antihypertensive drug use and the risk of prostate cancer (Canada), *Cancer Causes Control* 2004: 15: 535-541
33. Algazi M., Plu-Bureau G. et al.: Could treatments with β -blockers be associated with a reduction in cancer risk?, *Rev Epidemiol Sante Publique* 2004: 52: 53-65
34. Brentani M.M., Liberato M. H. et al.: Steroid receptors in Brazilian patients with large bowel cancer, *Braz J Med Biol Res* 1993: 26: 277-284
35. Alford G. T., Do H. M. et al.: Steroid hormone receptors in human colon cancers, *Cancer* 1979: 43: 980-984
36. Tutton P.J., Barkla D.H.: Steroid hormones as regulators of the proliferative activity of normal and neoplastic intestinal epithelial cells, *Anticancer Res* 1988: 8: 451-456
37. Iwagaki H., Hizuta A. et al.: Interleukin-1 receptor antagonists and other markers in colorectal cancer patients, *Scand J Gastroenterol* 1997: 32: 577-581
38. Mussi C., Angelini C. et al.: Alteration of hypothalamus-pituitary-adrenal glands axis in colorectal cancer patients, *Hepatogastroenterology* 2003: 50: 228-431
39. Thomas Robert P., Hellmich Mark R. et al.: Role of gastrointestinal hormones in the proliferation of normal and neoplastic tissues, *Endocrine Reviews* 2003: 24: 571-599
40. Townsend J. M., Singh P. et al.: Effects of gastrointestinal peptides on gastrointestinal cancer growth, *Gastroenterol Clin North Am* 1989: 18: 777-791
41. Rosenberg L.: Pancreatic cancer: does octreotide offer any promise?, *Chemotherapy* 2001: 47: 134-149
42. Rosenberg L.: Pancreatic cancer: a review of emerging therapies, *Drug* 2000: 59: 1071-1089
43. Schilling F.H., Ambros P. F. et al.: Absence of somatostatin receptor expression in vivo is correlated to di- or tetraploid 1p36-deleted neuroblastomas, *Med Pediatr Oncol* 2001: 36: 56-60
44. Orlando C., Raggi C. C. et al.: Somatostatin receptor type 2 gene expression in neuroblastoma, measured by competitive RT-PCR, is related to patient survival and to somatostatin receptor imaging by indium-111-pentetreotide, *Med Pediatr Oncol* 2001: 36: 224-226
45. Davis R. J.: Transcriptional regulation by MAP kinases, *Mol Reprod Dev* 1995: 42: 459-467

46. Beauchamp R. D., Townsend Jr. C. M. et al.: Proglumide, a gastrin receptor antagonist, inhibits growth of colon cancer and enhances survival in mice, *Ann Surg* 1985; 202: 303-309
47. Upp Jr. J. R., Singh P. et al.: Clinical significance of gastrin receptors in human colon cancers, *Cancer Res* 1989; 49: 488-492
48. Evers B. M., Zukura M. et al.: Neurotensin prevents intestinal mucosal hypoplasie in rats fed an elemental diet, *Dig Dis Sci* 1992; 37: 426-431
49. Feurle G. E., Muller B. et al.: Neurotensin induces hyperplasia of the pancreas and growth of gastric antrum in rats, *Gut* 1987;28: 19-23
50. Evers B. M., Izukura M. et al.: Neurotensin stimulates growth of colonic mucosa in young and aged rats, *Gastroenterology* 1992; 103: 86-91
51. Wood J. G., Hoang H. D. et al.: Neurotensin stimulates growth of small intestine in rats, *Am J Physiol* 1988; 25: 813-817
52. Gui X., Guzman G. et al.: Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma, *Peptides* 2008; 29: 1609-1615
53. Mustain C. W., Rychahou P. G. et al.: The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes, *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011; 18: 75-82
54. Heasley L. E.: Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer, *Oncogene* 2001; 20: 1563-1569
55. Drucker D. J.: Biological actions and therapeutic potential of the glucagons-like peptides, *Gastroenterology* 2002; 122: 531-544
56. Tavares W., Drucker D. J. et al.: Enzymatic- and renal-dependent catabolism of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide-2 in rats, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E134-E139
57. Kato Y., Yu D. et al.: Glucagon-like peptide-2 enhances small intestinal absorptive function and mucosal mass in vivo, *J Pediatr Surg* 1999; 34: 18-20
58. Dube P. E., Brubaker P. L. et al.: Frontiers in glucagon-like peptide-2: multiple actions, multiple mediators, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E460-465
59. Leen J. L., Izzo A. et al.: Mechanism of action of glucagon-like peptide-2 to increase IGF-1 mRNA in intestinal subepithelial fibroblasts, *Endocrinology* 2011; 152: 436-446
60. Barker J., Yusta B. et al.: ErbB activity links the glucagon-like peptide-2 receptor to refeeding-induced adaptation in the murine small bowel, *Gastroenterology* 2010; 138: 2447-2456
61. Yazbeck R. et al.: Growth factor based therapies and intestinal disease: Is glucagon-like peptide-2 the new way forward?, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2009; 20: 175-184

62. Rowland K. J. and Brubaker P. L. et al.: The “cryptic” mechanism of action of glucagon-like peptide-2, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301: G1-G8
63. Reisine T.: Somatostatin, *Cell Mol Neurobiol* 1995; 15: 597-614
64. Walsh J.H.: *Gastrointestinal hormones. Physiology of the Gastrointestinal Tract. 3. Auflage* ed. New York, USA: Raven Press 1994: 1-128
65. Parekh D., Izukura M. et al.: Endogenous somatostatin is an antitrophic factor for the gut and pancreas, *Digestion* 1990; 46: 84
66. Melen-Mucha G., Winczyk K. et al.: Somatostatin analogue octreotide and melatonin inhibit bromodeoxyuridine incorporation into cell nuclei and enhance apoptosis in the transplantable murine colon 38 cancer, *Anticancer Res* 1998. 18: 3615-3619
67. Wittamer V., Franssen J. D. et al.: Specific recruitment of antigen-presenting cells a chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids, *J Exp Med* 2003; 198: 977-985
68. Meder W., Wendland M. et al.: Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23, *FEBS Lett* 2003; 555: 495-499
69. Yoshimura T. and Oppenheim J. J.: Chemerin reveals its chimeric nature, *JEM* 2008; 205: 2187-2190
70. Zabel B. A., Allen S. J. et al.: Chemerin activation by serine protease of the coagulation, fibrinolytic and inflammatory cascade, *J Biol Chem* 20; 280: 34661-34666
71. Cash J. L., Hart R. et al.: Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23, *Exp Med* 28; 205: 767-775
72. Yoshimura T. and Oppenheim J. J.: Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C-motif) receptor-like 2 (CCRL2); Two multifunctional receptors with unusual properties, *Experimental Cell Research* 2011; 317: 674-684
73. Fan P., Kyaw H. et al.: Cloning and characterization of a novel human chemokine receptor, *Biochem Biophys Res* 1998; 243: 264-268
74. Migeotte I., Franssen J. D. et al.: Distribution and regulation of expression of the putative human chemokine receptor HCR in leukocyte populations, *Eur J Immunol* 2002; 32: 494-501
75. Wittamer V., Grégoire F. et al.: The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency, *J Biol Chem* 2004; 279: 9956-9962
76. Gantz I., Konda Y. et al.: Molecular cloning of novel receptor (CMKLR1) with homology to the chemotactic factor receptor, *Cytogenet Cell Genet* 1996; 74: 286-290

77. Vermi W., Riboldi E. et al.: Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin, *J Exp Med* 2005: 201: 509-515
78. Hart R., Greaves D. R.: Chemerin contributes to inflammation by promoting macrophage adhesion to VCAM-1 and fibronectin through clustering of VLA-4 and VLA-5, *J Immunol* 2010: 185: 3728-3739
79. Goralski K. B., McCarthy T. C. et al.: Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism, *J Biol Chem* 2007: 282: 28175-28188
80. Roh S. G., Song S. H. et al.: Chemerin- a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 2007: 362:: 1013-1018
81. Kaur J., Adya R. et al.: Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis, *Biochem Biophys Res Commun* 2010 391762-1768
82. Barnea G., Strapps W. et al.: The genetic design of signaling cascades to record receptor activation, *Proc Natl Acad Sci USA* 2008: 105: 64-69
83. Shimada T., Matsumoto M. et al.: A novel lipopolysaccharide inducible C-C chemokine receptor related gene in murine macrophages, *FEBS Lett* 1998: 425: 490-494
84. Patel L., Charlton S. J. et al.: Expression and functional analysis of chemokine receptors in human peripheral blood leukocyte populations, *Cytokine* 2001: 14: 27-36
85. Zabel B. A., Nakae S. et al.: Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and it required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis, *J Exp Med* 2008: 205: 2207-2220
86. Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods* 1983, 65:55-63
87. Berrada A., Denis M. G.: Glucocorticoid effects and receptors in two rat colon carcinoma cell lines differing by their tumorigenicity, *J Stereoid Biochem Molec Biol* 1990: 37: 223-230
88. Meyer A. S. and Schmidt T. J.: Potential mechanisms underlying autoregulation of glucocorticoid receptor mRNA levels in the DHD/K12/PROb rat colonic adenocarcinoma cell line, *J Stereoid Biochem Molec Biol* 1995: 55: 219-228
89. Sidler D., Renzulli P. et al.: Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids, *Oncogene* 2011: 30: 2411-2419
90. Braunschweiger P. G., Ting H. L.: Correlation between glucocorticoid receptor content and the antiproliferative effects of dexamethasone in experimental solid tumors, *Cancer Research* 1983: 43: 4757-4761

91. Tutton P. J., Barkla D. H.: Effects of glucocorticoid hormones on cell proliferation in dimethylhydrazine-induced tumours in rat colon, *Virchows Arch* 1981; 38: 247-251
92. Bouscarel B., Cortinovis C. et al.: Alpha 2-adrenoreceptors in the HT 29 human colon adenocarcinoma cell line: characterization with [³H]clonidine; effects on cyclic AMP accumulation, *Eur J Pharmacol* 1985; 107: 223-231
93. Sun L., Umemura S. et al.: Northern blot and ribonuclease protection study of alpha 2-adrenoreceptor subtypes in cultured cell lines, *Eur J Pharmacol* 1992; 226: 367-371
94. Nylund G., Nordgren S. et al.: Demonstration of functional receptors for noradrenaline and adenosine-5'-triphosphate, but not for prostaglandin E₂, in HT-29 human colon cancer cell line, *Autonomic & Autacoid Pharmacology* 2003; 23: 193-199
95. Masur K., Niggemann B. et al.: Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by β -blockers, *Cancer Research* 2001; 61: 2866-2869
96. Maoret J. J., Anini Y. et al.: Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice, *Int J Cancer* 1999; 80: 448-454
97. Yoshinaga K., Evers B. M. et al.: Neurotensin stimulates growth of colon cancer, *Surgical Oncology* 1992; 1: 127-134
98. Maoret J. J., Pospai D. et al.: Neurotensin receptor and its mRNA are expressed in many human cancer cell lines but not in normal colonic epithelium: binding studies and RT-PCR experiments, *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 465-471
99. Amar S., Kitabgi P. et al.: Activation of phosphatidylinositol turnover by neurotensin receptors in the human colonic adenocarcinoma cell line HT29, *FEBS Lett* 1986; 201:31-36
100. Ehlers R. A., Bonnors R. M. et al.: Signal transduction mechanism in neurotensin-mediated cellular regulation, *Surgery* 1998; 124: 239-247
101. Bozou J. C., Rochet N. et al.: Neurotensin stimulates inositol triphosphate-mediated calcium mobilization but not protein kinase C activation in HT 29 cells, *Biochem J* 1989; 264: 871-878
102. Masur K., Schwartz F. et al.: DPPIV inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells, *Regulatory Peptides* 2006; 137: 147-155
103. Koehler J. A., Harper W. et al.: Glucagon-like peptide-2 does modify the growth or survival of murine or human intestinal tumor cells, *Cancer Res* 2008; 68: 7897-7904
104. Thulesen J., Hartmann B. et al.: Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasm in mice, *Gut* 2004; 3: 1145-1150

105. Iakoubov R., Lauffer L. M. et al.: Carcinogenic effects of exogenous and endogenous glucagon-like peptide-2 in azoxymethane-treated mice, *Endocrinology* 2009: 150: 4033-40
106. Di Paolo A., Bocci G. et al.: Inhibitory effect of the somatostatin analogue SMS 201-995 and cytokines on the proliferation of the human colon adenocarcinoma cell line, *Pharmacol Res* 1995: 32: 135-139
107. Schally A. V.: Oncological application of somatostatin analogues, *Cancer Res* 1988: 48: 6977-6985
108. Chen J. S., Liang Q. M. et al.: Octreotide inhibits growth of colonic cancer SW480 cells by modulating the Wnt/P-catenin pathway, *Pharmazie* 2009: 64: 126-131
109. Hejna M, Schmidinger M. et al.: The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents: much ado about nothing?, *Annals of Oncology* 2002: 13: 653-668
110. Qu X., Han L. et al.: Detection of chemerin and its clinical significance in peripheral blood of patients with lung cancer, *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2009: 12: 1174-1177
111. Yang H., Li F. et al.: Chemerin regulates proliferation and differentiation of myoblast cells via ERK1/2 and mTOR signaling pathways, *Cytokine* 2012: 60: 646-652
112. Yamaguchi Y., Du X. Y. et al.: Proteolytic cleavage of chemerin protein is necessary for activation to the active form, Chem157S, which functions as a signaling molecule in glioblastoma, *Journal of Biological Chemistry* 2011: 286: 39510-39519
113. Zhao L., Yamaguchi Y. et al.: Chemerin158K protein is the dominant chemerin isoform in synovial and cerebrospinal fluids but not in plasma, *J Biol Chem* 2011: 286: 39520-39527
114. Luangsay S., Wittamer V. et al.: Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model, *J Immunol* 2009: 183: 6489-6499
115. Bondue B., Wittamer V. et al.: Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2011: 22: 331-338
116. Zabel B. A., Silverio A. M. et al.: Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood, *Journal of Immunology* 2005: 174: 244-251
117. Goralski K. B. and Sinal C.: Elucidation of chemerin and chemokine-like receptor-1 function in adipocytes by adenoviral-mediated shRNA knockdown of gene expression, *Methods in Enzymology*: 460: 289-312
118. Parolini S., Santoro A. et al: The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues, *Blood* 2007: 109: 3625-3632

119. Pachynski R. K., Zabel B. A. et al.: The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses, *JEM* 2012: 1-9
120. Lin W., Chen Y. L. et al.: Reduced expression of chemerin is associated with a poor prognosis and lowed infiltration of both dendrtic cells and natural killer cells in human hepacellular carcinoma, *Clin Lab* 2011:57:879-885
121. Edgar R., Domrachev M. et al.: Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository, *Nucleic Acids Res* 2002: 30: 207-210
122. Fernandez-Ranvier G. G., Weng J. et al.: Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression pArch Surg 2008: 143: 841-846
123. Segditsas S., Sieber O. et al.: Putative direct and indirect Wnt targets identified through consistent gene expression changes in APC-mutant intestinal adenomas from human and mice, *Hum Mol Genet* 2008: 17: 3864-3875
124. Stamey T. A., Warrington J. A. et al.: Molecular genetic profiling of Gleason grade 4/5 prostate cancers compared to benign prostatic hyperplasia, *J Urol* 2001: 166: 2171-2177
125. Rama D., Esendagli G. et al: Expression of chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) on J744A.1 macrophages co-cultured with fibroblast and /or tumor cells: Modeling the influence of microenviroment, *Cellular Immunology* 2011: 271: 134-140

8. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropin
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
BCA Protein Assay	Bicinchoninic Acid Protein Assay
cAMP	3`-5`-cyclo-Adenosinmonophosphat
CCRL2	Chemokine-(C-C Motiv)-Rezeptor 2
CD31	Cluster of Differentiation 31, Gefäßmarker
CD45	Cluster of Differentiation 45, Lymphozytenmarker
CG34	stabile wasserlösliche Chemerin-9-Variante
CG36	stabile Chemerin-9-Variante
CG37	stabile ITCC-Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Chemerin-9-Variante
CMKLR1	Chemokine-like receptor 1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol, Zellkernfluoreszenzfarbstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EGFR	Epidermal-Growth-Factor receptor
ERK1/2	Extracellular signal regulated kinase 1/2
FCS	fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
fmol	Femtomol
g	Gramm
G418	Geneticin 418
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GLP-2	Glukagon-like peptide-2
Gly2-GLP-2	stabile Variante von Glukagon-like peptide-2
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPR1	funktioneller Chemerinrezeptor
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER-2	Human-Epidermal-Growth-Factor
HTCA	Human Tumor Colony Forming Assay
IDCC	Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff

Abkürzungsverzeichnis

IGF-1/2	Insulin-like- Growth-Factor 1/2
IGF-I-R	Insulin-like- Growth-Factor I receptor
i.p.	intraperitoneal
ITCC	Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff Indotricarbocyanin
i.v.	intravenös
Ki67	Zellproliferationsmarker/Mitoseindex
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
m-RNA	messanger-Ribonukleinsäure
NK-Zellen	Natural killer Zellen
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
nM	Nanomolar
NSTR1	Neurotensinrezeptor 1
PBS	Phosphate Buffered saline
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-Polymerase chain reaction
s.c.	subkutan
sec	Sekunde
SOM230	stabiles Somatostatinanalogon
TGF	Transforming-Growth-Factor
VEGF	Vascular-Endothelial-Growth-Factor
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
°C	Grad Celsius
%	Prozent

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Justa Friebus-Kardash, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Die Rolle von Stress- und Peptidhormonen bzw. Chemerin und Chemerinrezeptoren in der Tumorbilogie des kolorektalen Karzinoms] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum 14.02.2014

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Danksagung

Ich möchte mich bei PD Dr. Cramer für die Unterstützung und Betreuung meiner Dissertation bedanken. Gleichzeitig danke Prof. Dr. Wiedenmann, an dessen Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie meine Doktorarbeit durchgeführt wurde.

Ich danke auch sehr Dr. Carsten Grötzinger, der Interesse für meinen Vorschlag für Doktorarbeitsthema zeigte, mir bei der Erarbeitung des Konzeptes für die Arbeit half und mich bei der Fortführung meines Projektes unterstützte sowie mir viel Freiraum für neue Ideen gab. Außerdem danke Dr. Grötzinger für die Durchführung der Messungen am IN-Cell Analyzer für den DAPI-Proliferationsassay sowie für die Übernahme der Kosten für die Teilnahme am Tierkurs.

Mein besonderer Dank gilt an Dr. Petra Schulz, die den Fortgang meines Projektes bis zum Ende beaufsichtigte, mich in die Zellkultur, den HTCA und die tierexperimentellen Methoden einführte und bei Fragen zu den Tierversuchen mir immer zur Hilfe stand.

Zusätzliche danke ich allen Mitarbeitern der AG Grötzinger, insbesondere Ines Eichhorn für die Einarbeitung in die Methoden für immunhistochemische bzw. Immunfluoreszenzfärbungen, Dr. Quirino Schefer für die Betreuung des Internalisierungsassays sowie Yvonne Giesecke für die Bereitstellung der Zelllinien und Peptide.

Am Ende möchte ich mich natürlich bei meiner Familie für ihr Verständnis und moralische Unterstützung bedanken.